

Інститут молекулярної біології і генетики
Національна Академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГЕРАЩЕНКО ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.218+616-006.6+616.65

ДИСЕРТАЦІЯ

**ГЕНЕТИЧНІ, ЕПІГЕНЕТИЧНІ ТА ЕКСПРЕСІЙНІ ПОРУШЕННЯ У НИЗЦІ
ЕПІТЕЛІЙНИХ ПУХЛИН**

03.00.03 «Молекулярна біологія»,

03.00.22 «Молекулярна генетика»

091 - Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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



Геращенко Г.В.

Науковий консультант Кашуба Володимир Іванович, д.б.н., професор.

Київ - 2019

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертаційна робота присвячена пошуку та ідентифікації порушень регулювання експресії генів у пухлинах епітелійного походження на різних молекулярних рівнях, а саме генетичному, епігенетичному та експресійному. Ці зміни вивчались у низці епітелійних пухлин людини з метою виявлення на основі отриманих результатів груп генів потенційних біомаркерів та мішеней для таргетної терапії, задіяних в патогенезі онкологічних захворювань та важливих для характеристики специфічних молекулярних підтипів, ступеня прогресії, агресивності та потенціалу до метастазування та діагностики. Такі дані можуть бути використані як для раннього виявлення епітелійних новоутворень, прогнозу перебігу захворювання на рак та пошуку ефективної персоналізованої терапії.

Як метод широкомасштабного скринінгу генетичних та/або епігенетичних порушень у роботі використано NotI-мікропанелі, стандартні молекулярно-біологічні і молекулярно-генетичні методи: аналіз кількості копій генів, втрата гетерозиготності, метил-специфічна ПЛР, бісульфітне секвенування, секвенування за Сенгером, нозерн-блот гібридизація, ПЛР, ПЛР у реальному часі, трансфікування культур клітин, тести на ріст пухлин *in vivo* на мишах, флуоресцентна мікроскопія, гістологічні, імуногістохімічні методи, статистичні, біоінформативні та інші.

В огляді літератури описано та проаналізовано джерела літератури, що складають сучасні уявлення про молекулярні особливості канцерогенезу та підходи до діагностики й лікування. Актуалізовано онкогенні властивості

пухлинних клітин. Розглянуто основні теорії та гіпотези канцерогенезу. Описано поширеніші генетичні та епігенетичні аберації при канцерогенезі низки епітелійних пухлин, зокрема легені, нирки, молочної залози, шийки матки, кишечника, передміхурової залози. Проаналізовано відомі пухлино-асоційовані клітинні шляхи. Розглянуто перелік основних онкогенів та генів супресорів росту епітелійних пухлин. Описано відомі генетичні та/або епігенетичні порушення 3-ої хромосоми людини, що задіяні в канцерогенезі епітелійних пухлин. Проведено аналіз особливостей метаболізму та міжклітинних взаємодій у канцерогенезі, серед яких важливі ролі грають епітелійно-мезенхімний перехід, метаболічне репрограмування ракових клітин, яке охоплює майже всі типи обміну речовин у клітинах. Ці процеси у свою чергу впливають на склад та фенотип клітин стромы, що оточують пухлини, провокуючи появу пухлино-асоційованих фіброblastів, пухлино-асоційованих макрофагів та супресивного імунного оточення – лейкоцитів, що інфільтрують пухлини та інших клітинних елементів, що підтримують розвиток та метастазування пухлин. Крім того висвітлено сучасні досягнення в галузі широкомасштабного пошуку молекулярних порушень у пухлинах завдяки методам мікрочипів, секвенування нового покоління, мас-спектрометрії нового покоління. Проаналізовано підходи до виявлення біомаркерів для діагностики та мішеней для таргетної терапії епітелійних пухлин.

У результаті проведення власних досліджень отримано та проаналізовано дані NotI-мікропанелей для 180 клонів 3-ої хромосоми людини в геномній ДНК епітелійних пухлин, зокрема, яєчника, кишечника, передміхурової та молочної залоз.

Аналізом результатів NotI-мікропанелей 3-ої хромосоми людини у 7-и локалізаціях епітелійних пухлин різного тканинного походження виявлено 74 гени та/або локуси зі значущими генетичними та/або епігенетичними порушеннями. 20 з них характерні для 5-7 типів пухлин (загально-пухлинні порушення), а 23 гени та/або локуси є пухлино-специфічними. Показано, що найбільшу кількість індивідуальних генетичних та/або епігенетичних порушень

виявлено для пухлин передміхурової залози, що свідчить про особливості канцерогенезу, відмінні від інших типів епітелійних пухлин.

Ідентифіковано десятки генів та/або локусів, що мають генетичні та/або епігенетичні порушення у зразках пухлин, які свідчать про інактивацію низки генів-супресорів росту пухлин та потенційних генів-супресорів пухлин на 3p та 3q-плечі 3-ої хромосоми людини в епітелійних пухлинах. За допомогою інших методів проведено підтвердження отриманих результатів. Для генів *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *RBSP3* і *SEMA3B* виявлена епігенетична інактивація, а саме метилювання промоторів генів, а для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* і *GPX1* встановлено генетичні зміни у пухлинах - гемізіготні делеції. Для генів *GORASP1*, *GNAI2*, *NKIRAS1*, *GPX1*, *GPX3*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *SEMA3B*, *BHLHE40*, *BCL6* і *ITGA9* генетичні та/або епігенетичні порушення корелюють зі зниженнями відносної експресії у епітелійних пухлинах.

Для потенційного гена супресора росту пухлин *SEMA3B*, нами виявлено метилювання промоторного та інтронного CpG-острівця у пухлинах нирки та легені й визначено зниження експресії у цих видах пухлин. В експериментах *in vitro* та *in vivo* встановлено його пухлино-супресорну активність на прикладі пухлин легені.

Наступна частина роботи присвячена виявленню диференційно-експресованих генів у пухлинах передміхурової залози як на модельних клітинних лініях з різним потенціалом агресивності та метастазування, так і на зразках пухлин. А також встановленню особливостей пухлино-стромальної взаємодії на рівні експресії маркерів пухлинних клітин та елементів строми раку передміхурової залози, який є одним з найбільш гетерогенних.

Порівняльним аналізом відносної експресії 65 генів на модельних клітинних лініях раку передміхурової залози LNCaP, DU145, PC3 та умовно-нормальної клітинної лінії PNT2 виявлено 35 диференційно-експресованих генів, які кодують білки, що належать до сигнальних шляхів p53, NF-kB, Wnt, адгезії клітин, інвазивності та метастазування, серед них гени *IL1B*, *TAGLN*, *EFNA5*, *IL8*, *CXCL1* і *CCNB2*. Вивчення відносних рівнів експресії 84 генів у

клітинних лініях LNCaP та PC3 дозволило виявити 36 диференційно-експресованих генів, асоційованих з процесами апоптозу, адгезії, інвазивності та метастазування, серед яких *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *TGFBI*, *SERPINB5* й *SERPINE1*. Відібрані за результатами дослідів на клітинних лініях 7 пухлино-асоційованих генів: *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, *EPDR1* та *FOS*, показали значущі відмінності рівнів відносної експресії у групах аденокарцином на різних стадіях і з різною сумою за шкалою Глісона у порівнянні з умовно-нормальними тканинами та аденомами передміхурової залози. Отримані дані лише частково співпадають з результатами експресії на клітинних лініях, що можна пояснити наявністю експресії генів у різних типах клітин й особливостями канцерогенезу індивідуальних пухлин.

Нами проведено розрахунки та експерименти для вивчення впливу різниці між рівнями експресії досліджуваних генів та референсних на статистичні показники відносної експресії генів. Ми підтвердили можливість використання трьох комбінацій референсних генів (*TBP*, *TBP* і *HPRT*, та чотирьох разом: *TBP*, *HPRT*, *ALAS1* і *TUBA1B*) для нормалізації розрахунків відносної експресії у пухлинах передміхурової залози. Важливими параметрами для вибору порогу відмінностей рівнів експресії між групами з метою правильної інтерпретації даних є рівні експресії досліджуваних генів, різниця значень експресії між досліджуваними групами, розмір вибірки та наявність високої гетерогенності даних експресії у групі.

Аналіз особливостей експресії генів маркерів клітин пухлин та елементів строми пухлин передміхурової залози розпочали з генів, що характеризують епітелійно-мезенхімний перехід. Нами вперше на групі хворих з української популяції виявлено гібридний транскрипт *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1) у аденокарциномах передміхурової залози з частотою 56,8%, в умовно-нормальних тканинах з частотою 43,2% та аденомах - 20%. Аналіз частот експресії транскрипта у пухлинах з різними стадіями дає підставу стверджувати про його появу на ранніх етапах канцерогенезу передміхурової залози. З 19 генів, пов'язаних з епітелійно-мезенхімним переходом у аденокарциномах з

різними клініко-патологічними характеристиками, умовно-нормальних тканинах та аденомах виявлено низку диференційно-експресованих генів: *AR*, *CDH1*, *KRT18*, *MMP9* і *OCLN*, які кодують протеїни, так і генами довгих некодувальних РНК (*PCAZ*, *HOTAIR* і *SCHLAP1*). Серед генів, асоційованих з раком передміхурової залози у зразках пухлин виявлено 10 диференційно-експресованих генів, серед яких *ESR1*, *GCR*, *PRLR*, *VDR* і *SRD5A2*.

Виявлення та аналіз рівнів відносної експресії важливих у канцерогенезі передміхурової залози генів ліпідного обміну, які охоплюють різні ланки цього процесу, показало, що чотири гени з п'яти: *FASN*, *LDLR*, *HMGCR* і *COX2* мають значні зміни відносної експресії у аденокарциномах з різними стадіями та сумою за шкалою Глісона у порівнянні з аденомами й умовно-нормальними тканинами, що свідчить про значні порушення обміну ліпідів при прогресії раку передміхурової залози, що стосуються як клітин пухлин, так і стромальних елементів.

Встановлення рівнів відносної експресії 23 генів, пов'язаних з елементами строми пухлин (фібробластами та макрофагами) та імуно-асоційованих генів у аденокарциномах в порівнянні з аденомами передміхурової залози показало наявність 11 диференційно-експресованих генів, з яких 7 генів мають підвищену експресію у злоякісних пухлинах: *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CD163*, *CCL17*, а чотири – знижену: *CCR4*, *NOS2A*, *MSMB*, *IL1R1*. Найбільшу кількість змін встановлено у групах аденокарцином з різними стадіями захворювання (*CXCL12*, *CXCL14*, *CTGF*, *FAP*, *HIF1A*, *THY1*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, *CTLA4* і *IL1R1*), що свідчить про важливу роль стромальних елементів у канцерогенезі передміхурової залози.

Порівняльний аналіз даних експресії, встановлений на рівні мРНК і протеїну п'яти генів (*TGFB1*, *IL1B*, *FOS*, *TAGLN*, *PLAU*) та встановлення кореляцій між рівнями експресії досліджуваних генів й маркерів різних типів клітин (епітелійних та елементів строми) показав, що завдяки комплексному

використанню імуногістохімічного й кПЛР методів можливе встановлення типу клітин, в яких відбувається експресія генів.

Базуючись на результатах відносної експресії 59 транскриптів генів-маркерів пухлинних клітин, стромы та імунної системи виявлено специфічні профілі експресії 37 генів у аденокарциномах передміхурової залози, причому 30 з них мають значущі кореляції з клініко-патологічними характеристиками пухлин, що є основою для молекулярного профілювання раку передміхурової залози. За допомогою кластерного аналізу (кластеризування за K-значеннями) виявлено 2 молекулярні підтипи аденокарцином на основі відносної експресії генів, пов'язаних з епітелійно-мезенхімним переходом, але ці підтипи не мали значущих відмінностей у клініко-патологічних характеристиках. Тоді як кластеризація за рівнями відносної експресії груп генів-маркерів пухлинних клітин разом з генами, пов'язаними з епітелійно-мезенхімним переходом, так і елементів стромы виявило 3 клінічно-значущі молекулярні підтипи аденокарцином з характерними маркерами різних підтипів та стадій раку. Встановлено, що найбільшу кореляцію між молекулярними підтипами пухлинних клітин мають підтипи пухлино-асоційованих фібробластів та макрофагів, що свідчить про їх активну участь у канцерогенезі.

За результатами NotI-мікропанелей розроблено набори маркерів для диференційованої діагностики пухлин яєчника. Для виявлення раку в біопсіях яєчника на всіх етапах, включаючи ранню діагностику, найбільш перспективним з аналізованих генів є набір з 10 маркерів (*NKIRAS1 / RPL15, THRБ, RBPS3 (CTDSPL), IQSEC1, NBEAL2, ZIC4, LOC285205, FOXP1, CGGBP1* і *EPHB1*), який дозволяє діагностувати більшість випадків епітелійних пухлин яєчника з чутливістю та специфічністю від 71% до 94%.

Для виявлення пухлин передміхурової залози за даними NotI-мікропанелей запропоновано набір з шести маркерів: *BHLHE40, FOXP1, LOC285205, ITGA9, CTDSPL (RBSP3)* і *FGF12*. Чутливість і специфічність цього набору становили 94% для розглянутої вибірки. Наступний набір п'яти

маркерів: *FAM19A4*, *CAND2*, *MAP4*, *KY* і *LRRC58* дозволяє розрізнити зразки аденом від неагресивних пухлин з чутливістю 93% та специфічністю 73%.

Останній набір у цьому комплекті включав п'ять маркерів: *LOC440944/SETD5*, *VHL*, *CLCN2*, *OSBL10/ZNF860* і *LMCD1*, які дозволять розрізнити між собою агресивні раки від неагресивних пухлин та аденом (100% чутливість і 97% специфічність). Для повного та достовірного аналізу необхідно використовувати повний набір з 16 маркерів для встановлення та розрізнення за агресивністю пухлин передміхурової залози.

На основі даних відносної експресії нами проведено потенційну оцінку діапазонів чутливості до препаратів інгібіторів для низки генів: *AR*, *PTEN*, *COX2*, *LDLR*, *HMGCR*, *FASN* і *CTLA4*. Виявлено, що, різниця між мінімальним та максимальними значеннями експресії для *HMGCR*, *FASN*, *LDLR* і *CTLA4* сягає більше, ніж 100 разів, що свідчить про актуальність визначення рівнів експресії до призначення таргетних препаратів.

Нами також проведено розробку алгоритму для представлення даних відносної експресії генів з метою підбору панелей біомаркерів за методом машинного навчання з використанням MDR аналізу. Завдяки цьому нами розроблено експресійний набір з 12 біомаркерів для виявлення та розрізнення аденокарцином передміхурової залози з високими статистичними показниками: *CDH2*, *CXCL12*, *CCL17*, *ESR1*, *FN1*, *IL1R1*, *HIF1A*, *HOTAIR*, *KRT18*, *PCA3*, *S100A4* і *VDR* для диференційної діагностики аденокарцином від аденом та розрізнення аденокарцином за їх стадією (1-2 і 3-4 стадії) і сумою за шкалою Глісона ($CG \leq 7$ і $CG > 7$). Цей комплексний набір включає 3 сети для стратифікації. Кожен з них має свої статистичні параметри. Найвищі параметри чутливості, специфічності, точності та OR має набір біомаркерів розрізняє аденоми та злоякісні пухлини передміхурової залози (1,0; 0,8; 0,93; >200 відповідно).

Ключові слова: злоякісні епітелійні пухлини, генетичні аберації, метилювання промоторів генів, NotI-мікропанелі, 3-я хромосома людини, гени-

супресори росту пухлин, пухлино-асоційовані гени, відносна експресія генів, пухлино-стромальні взаємодії, молекулярне профілювання, панелі біомаркерів.

Список публікацій за темою дисертації Геращенко Г.В.:

1. Гордіюк ВВ, Геращенко ГВ, Скрипкіна ІЯ, Симончук ОВ, Павлова ТВ, Угрин ДД, Манжура ОП, Вакуленко ГО, Забаровський ЄР, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Виявлення епігенетичних і генетичних порушень та зміни експресії генів 3-ої хромосоми людини при раку яєчника. *Biopolym Cell*. 2008; 24(4):323-332. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007B0>
2. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Skrypkinia IY, Kvasha SM, Kolesnik OO, Ugryn DD, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2009 Jul-Aug;81(4):81-7.
3. Gerashchenko GV, Bogatyrova OO, Rudenko EE, Kondratov AG, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Vozianov OF, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of NKIRAS1 gene in human renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2010 Jul;32(2):71-5.
4. Руденко ЄЄ, Геращенко ГВ, Гордіюк ВВ, Кондратов АГ, Кашуба ВІ. PPM1M як потенційний ген супресор росту пухлин у світлоклітинних карциномах нирки людини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2011; 11:522-26.
5. Kondratov AG, Stoliar LA, Kvasha SM, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Gerashchenko AV, Vozianov AF, Rynditch AV, Zabarovsky ER, Kashuba VI. Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas. *Mol Med Rep*. 2012 Feb;5(2):509-12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.681>.
6. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk VV, Gerashchenko AV, Braga EA, Yenamandra SP, Lerman M, Senchenko VN, Zabarovsky E. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and

prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct 18;13(10):13352-77. <https://doi.org/10.3390/ijms131013352>.

7. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Bogatyrova OO, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of *GPX1* and *GPX3* in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell.* 2013; 29(5):395-401. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00082F>

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

9. Розенберг ЄЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григорь'єва ЕВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини. *Biopolym Cell.* 2013; 29(6):499-505. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000840>

10. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів у нормальній клітинній лінії та у клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86(2):119-28.

11. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. *PPM1M* and *PRICKLE2* are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell.* 2014; 30(3):229-233. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089A>

12. Rudenko EE, Lapska YV, Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Vikarchuk MV, Kashuba VI. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of *PPM1M* and *PRICLE2* genes in human clear cell renal cell carcinomas. *Biopolym. Cell.* 2015; 31(1):29-33. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008C9>

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

14. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Chashchina LI, Kazubskaya TP,

Kondratieva TT, Lerman MI, Angeloni D, Braga EA, Kashuba VI. Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 2015 May 11;10(5):e0123369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123369>.

15. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, Kudryavtseva AV, Beniaminov AD, Belova AA, Bondarenko YN, Danilets RO, Glukhov AI, Kondratov AG, Alexeyenko A, Alekseev BY, Klein G, Senchenko VN, Kashuba VI. Identification of Novel Epigenetic Markers of Prostate Cancer by NotI-Microarray Analysis. *Dis Markers*. 2015; 2015:241301. <https://doi.org/10.1155/2015/241301>.

16. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, Vitruk YV, Gryzodub OP, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol*. 2017 Jul; 39(2):131-137.

17. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Vozianov SO, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Detection of prostate specific ETS fusion transcripts in cancer samples. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(4):256-267. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000958>

18. Gerashchenko GV, Mankovska OS, Dmitriev AA, Mevs LV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(5):335-355. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00095E>

19. Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Chashchina LI, Gryzodub OP, Kashuba VI. A role of expression level of reference and investigated genes in prostate tumors for qPCR analysis. *Biopolym Cell*. 2018; 34(2):85-96. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000973>

20. Геращенко ГВ, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози. *Допов. Нац. акад. наук Укр*. 2018; 6:113-9. <https://doi.org/10.15407/dopovidy2018.06.113>

21. Gerashchenko GV, Mevs LV, Chashchina LI, Pikul MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of steroid and peptide hormone receptors,

metabolic enzymes and EMT-related genes in prostate tumors in relation to the presence of the TMPRSS2/ERG fusion. *Exp Oncol.* 2018 Jun;40(2):101-108.

22. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic alterations of human chromosome 3, investigated by NotI-microarrays in seven types of epithelial cancers. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(4):303-312. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000983>

23. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Kononenko OA, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression pattern of genes associated with tumor microenvironment in prostate cancer. *Exp Oncol.* 2018 Dec;40(4):315-322.

24. Gerashchenko GV, Kononenko OA, Bondarenko YuM, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression patterns of genes that regulate lipid metabolism in prostate tumors. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(6):445-460. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000990>

25. Геращенко ГВ, Григоруку ОВ, Мевс ЛВ, Кашуба ВІ. РТЕН- пов'язані зміни експресії генів у пухлинах передміхурової залози людини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2018; 22:113-9.

26. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Development of gene expression panels to determine prostate cancer. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019; (1):100-6. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.100>

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

28. Gerashchenko GV, Chashchina LI, Rynditch AV, Kashuba VI. The gene expression pattern as a tool for assessment of components of microenvironment and response to anti-cancer therapy of prostate tumors. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019; (4):86-93. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.04.086>.

Апробація результатів дисертації:

29. Rosenberg E, Gerashchenko G, Kashuba V. Search for potential biomarkers of prostate cancer. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів. Львів. 2014. 8-11 квітня., 2014; Збірник тез:230-231.

30. Rosenberg E., Gerashchenko G, Kashuba V. Effect of D-Glucuronyl C5-Epimerase expression in prostate cancer cell lines. XI Український біохімічний конгрес 6-10 жовтня 2014 р., м.Київ, Україна. Ukr Biochem J. 2014; 86(5):29, Suppl. 2.
31. Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Snezhkina AV, Gerashchenko AV, Rudenko EE, Rosenberg EE, Puzanov GA, Puzanov MA, Alekseev BY, Senchenko VN, Kashuba VI. Comparative analysis of methylation/deletion patterns of chromosome 3 in different cancer types using NotI-microarrays. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug - 4 Sept 2014. FEBS Journal. 2014;281(Suppl. 1):297-98. <https://doi.org/10.1111/febs.12919>
32. Rozenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. 2nd EACR Special Conference on Cancer Genomics, 28 June-01 July 2015, Cambridge, UK, EACR Conference Series. 2015:53.
33. Розенберг ЄЕ, Кашуба ВІ, Геращенко ГВ, Литвиненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку передміхурової залози. XIII з'їзд онкологів та радіологів України 26-28 травня 2016, Київ, Україна. Укр. Радіол. журнал. 2016;Додаток 1:114-115.
34. Rozenberg EE, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Bondarenko YuN, Danilets RO, Kashuba VI. Prostate tumors characterization by NotI-microarrays. International scientific conference “Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer”, June 13-15, 2016, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol, 2016;38(2):138.
35. Rozenberg E, Gerashchenko G, Hryshchenko N, Lytvinenko N, Vitruk Yu, Gryzodub O, Stakchovsky E, Kashuba V. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” May 11, 2017 Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2017;39(2):157–160.
36. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rozenberg YE, Kashuba VI. TMRSS2-ERG dependent gene expression changes and possible fusion mechanism in prostate tumors. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology

and Genetics NAS of Ukraine, May15-16, Kyiv, Ukraine, Biopolym Cell. 2018;34(2):154.

37. Gerashchenko G, Rozenberg Y, Mevs L, Pikul M, Gryzodub O, Stakhovsky E, Kashuba V. Expression profiling of prostate tumor specific genes. Symposium and summer school “Fundamental principles of cancer biotherapy”, May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2018;40(2):158-9.

38. Gerashchenko GV, Kashuba VI. Molecular characteristics of an interaction between prostate tumor cells and the host organism. XI PARNAS Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J. 2018;90(Special Issue):73.

39. Gerashchenko G, Kashuba V. Molecular profiling of prostate tumors. “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2018”, 31 October-2 November, 2018, Prague, Czech Republic, Biological markers in fundamental and clinical medicine (collection of abstracts). 2018;2(2):25.

SUMMARY

Gerashchenko G.V. “Genetic, epigenetic and expression alterations in several types of epithelial tumors” - Qualifying scientific work, manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Biological Sciences in specialties 03.00.03 "Molecular Biology" and 03.00.22 "Molecular Genetics" (091 - Biology). - Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the identification of alterations in regulation of gene expression in epithelial tumors at different molecular levels, i.e. chromosome aberrations, global epigenetic changes and the status of individual genes. Based on the obtained results, we identified several groups of genes that can serve as putative biomarkers and also targets for anti-tumor therapy. The identified genes are involved in the pathogenesis of oncological diseases and are important for the characterization

of specific molecular tumor subtypes, and also for diagnosis and prediction of a course of disease, i.e. progression, aggressiveness and metastasizing. Our data can be used for the early detection of epithelial tumors, the prediction of the course of the cancer disease and for suggestion of the effective personalized therapy.

In order to perform a large-scale screening of genetic and/or epigenetic alterations, we used the NotI-microarrays and the standard molecular-biological and molecular-genetic methods: an analysis of a copy number of genes, loss of heterozygosity (LOH), methyl-specific PCR, bisulfite treatment, Sanger's sequencing, Northern blot hybridization, PCR, Real Time PCR, transfection of cell cultures, animal experiments, fluorescence microscopy, histology, immuno-histochemistry, methods of statistics, bioinformatics, etc.

In the literature review, we analyzed and presented the modern ideas on molecular characteristics of carcinogenesis and also approaches to diagnostics and treatment of cancer diseases. Moreover, we discussed properties of tumor cells, the main theories and hypotheses of carcinogenesis. Also, we analyzed the most frequently detected genetic and epigenetic aberrations in a number of epithelial tumors, in particular, lung, kidney, breast, cervix, colon and prostate. We discussed the main tumor-associated cellular pathways and prepared a list of major oncogenes and tumor-suppressor genes.

Aberrations, described in the present work, represent the genetic and/or epigenetic alterations of the human Chromosome 3, involving in carcinogenesis of epithelial tumors. Also, metabolic features of tumors and intercellular interactions upon carcinogenesis, such as epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metabolic reprogramming were also analyzed. These processes, in turn, influence on the composition and phenotype of stroma cells, surrounding the tumor, inducing the appearance of cancer-associated fibroblasts and tumor associated macrophages. Moreover, the suppressive immune environment arises, i.e. leukocytes, infiltrating tumors and also other cellular elements, supporting metastasizing. The present achievements in the high-throughput search for molecular disorders upon carcinogenesis are due to the development of the modern experimental methods, such

as microarrays, the next generation sequencing and the next generation of mass spectrometry. These approaches led to discovery of biomarkers for diagnosis and as targets for anti-cancer therapy.

In the present work, we obtained and analyzed the data on the NotI-microarrays for 180 genes and/or loci of human Chromosome 3 in epithelial tumors, in particular, ovary, colon, prostate and breast. Analyzed our and literature NotI-microarrays data in 7 tissue localization of epithelial tumors, we found that 74 genes and/or loci showed significant genetic and/or epigenetic alterations in epithelial tumors of seven tissue of various origin. Alterations in 20 genes are common for at least 5 tumor types (general tumor abnormalities), and other 23 genes and/or loci are tumor-specific. The highest number of tumor-specific genetic and/or epigenetic alterations was found for prostate tumor, indicating distinct mechanisms of cancerogenesis, compared with other types of epithelial tumors.

Data, obtained for dozens of genes and/or loci, showing significant genetic and/or epigenetic alterations in tumors, including inactivation of a number of tumor-suppressor genes (putative tumor suppressor genes) from the human Chromosome 3, were validated by other methods. Epigenetic changes, i.e. methylation of a gene promoter, were detected for *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *RBSP3* and *SEMA3B*. Genetic alterations, f.e. hemizygous deletions, was found for *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* and *GPX1*. For a number of genes, genetic and/or epigenetic alterations were confirmed, and gene expression levels were decreased, according to a quantitative PCR, i.e. for *GORASP1*, *GNAI2*, *NKIRAS1*, *GPX1*, *GPX3*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *SEMA3B*, *BHLHE40*, *BCL6* and *ITGA9*.

For the putative tumor suppressor gene *SEMA3B*, we detected methylation of the promoter and intron CpG-islet in renal and lung tumors and also decreased gene expression in these tumor types. Moreover, we shown the tumor suppressor activity of *SEMA3B* both, *in vitro* and *in vivo*.

The next part of the dissertation work is devoted to the investigation of differentially expressed genes in human prostate tumors and model cell lines with various aggressiveness and metastatic potential. The tumor-stroma interactions were

analyzed also, because prostate tumors represent one of the most heterogeneous malignant neoplasms.

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

We calculated relative expression levels of each gene, using a set of reference genes for comparison. We confirmed the possibility to use one reference gene *TBP* or simultaneously a combination of three (*TBP*, *TBP* and *HPRT*) and four (*TBP*, *HPRT*, *ALAS1*, *TUBA1B*) reference genes for normalization of the obtained results. These important parameters are needed to set the threshold to calculate differences in gene expression levels between experimental groups to achieve the correct interpretation of the experimental data, because we are dealing with the high heterogeneity in each sample group and the sample size.

We started the expression analysis of the tumor cell markers and also markers of stroma cells from the genes, characterizing EMT.

Importantly, for the first time the fusion transcript TMPRSS2-ERG (EF194202.1) was detected in prostate cancer patients in the group of Ukrainian

population. A frequency of the presence of the fusion transcript was high in prostate adenocarcinomas (56.8%), compared with the paired conditionally normal tissues (43.2%) and adenomas (20%). Based on the frequency, we may speculate that the fusion occurs at the early stages of carcinogenesis of the prostate gland. Several differentially expressed genes (out of 19 EMT associated genes) were found, when adenocarcinomas were compared with conventionally normal tissues and adenomas, namely *AR*, *CDH1*, *KRT18*, *MMP9*, *OCLN*, *PCA3*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*, and also genes of lncRNAs (*PCA3*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*). 10 differentially expressed genes were found in prostate tumor samples, including *ESR1*, *GCR*, *PRLR*, *VDR*, *SRD5A2*.

The analysis of relative expression levels of genes, associated with lipid metabolism, showed that four out of five investigated genes (*FASN*, *LDLR*, *HMGCR* and *COX2*) exhibited significant changes in relative expression in adenocarcinomas of the different stages and the Gleason score, in comparison with adenomas and conditionally normal tissues. These data indicate significant lipid metabolism disorders upon prostate cancer progression, affecting both, tumor and stroma cells.

11 out of 23 genes, associated with tumor stroma elements (fibroblasts and macrophages) and also immune-associated genes, showed differential expression in prostate adenocarcinomas, compared with prostate adenomas. Seven of them were increased in malignant prostate tumors, namely *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CD163* and *CCL17*. Four genes, namely *CCR4*, *NOS2A*, *MSMB* and *IL1R1* were decreased. The largest number of expression changes was observed in an adenocarcinoma group, consisting of tumors at the different stage of disease (*CXCL12*, *CXCL14*, *CTGF*, *FAP*, *HIF1A*, *THY1*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, *CTLA4*, *IL1R1*), indicating an important role of stroma elements in prostate carcinogenesis.

A comparative analysis of the gene expression at the mRNA and protein levels was performed for five genes (*TGFB1*, *IL1B*, *FOS*, *TAGLN*, *PLAU*); the putative correlation between expression levels and markers of epithelial and stroma elements was calculated.

Overall, we studied the relative expression of 59 genes/transcripts (at the mRNA level), serving as markers of tumor cells, stroma elements and cells of the immune system. We found that expression patterns of 37 genes are specific for prostate adenocarcinomas. 30 of them showed significant correlations with the clinical and pathological characteristics of prostate tumors, creating the basis for molecular profiling of prostate cancer. The cluster analysis (K-means clustering) allowed us to characterize two molecular subtypes of prostate adenocarcinomas, based on relative expression levels of the genes, associated with EMT. However, these two subtypes were not perfectly correlated with the clinico-pathological characteristics.

Clustering by relative expression levels of tumor markers, together with EMT genes and stroma elements, resulted in 3 clinically significant molecular subtypes of prostate adenocarcinomas, including the stage. The best correlation was calculated between the molecular subtypes of tumors and markers of the cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages, which indicates an active involvement of microenvironment in prostate carcinogenesis.

With the help of the NotI-microarrays, we have developed a panel of diagnostic markers for ovarian tumors. For the early diagnostics, the most promising are the following 10 markers: *NKIRAS1/RPL15*, *THRB*, *RBPS3 (CTDSPL)*, *IQSEC1*, *NBEAL2*, *ZIC4*, *LOC285205*, *FOXP1*, *CGGBP1* and *EPHB1*, that allowed us to distinguish/diagnose the majority of ovarian tumors with a sensitivity and specificity higher than 71% to 94%, correspondingly.

A set of the following six markers was proposed for detection of prostate tumors, according to the NotI-microarray data: *BHLHE40*, *FOXP1*, *LOC285205*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)* and *FGF12*. The sensitivity and specificity of this set were 94%. The next set of five markers, namely *FAM19A4*, *CAND2*, *MAP4*, *KY* and *LRRC58* allowed us to distinguish between adenoma (non-aggressive tumors) and adenocarcinomas with a sensitivity of 93% and a specificity of 73%.

The last set in the proposed panel includes five markers: *LOC440944/SETD5*, *VHL*, *CLCN2*, *OSBL10/ZNF860* and *LMCD1*, which will distinguish between

aggressive and non-aggressive cancers with 100% sensitivity and 97% specificity. For the complete and reliable analysis, it is necessary to use a complete panel of 16 markers.

The obtained data on the relative expression allowed us to predict potential ranges of the sensitivity of tumor cells to the specific inhibitor drugs, using expression pattern of several genes, such as *AR*, *PTEN*, *COX2*, *LDLR*, *HMGCR*, *FASN* and *CTLA4*. Differences in the minimal and maximal values of relative expression for *HMGCR*, *FASN*, *LDLR* and *CTLA4* was more than 100 folds, indicating necessity of assessment of gene expression levels, prior using the certain drugs.

Moreover, we developed an algorithm for presenting relative gene expression data as a method to select the biomarker panels, using a machine learning method (MDR analysis). Using the proposed algorithm, we developed the expression panel of 12 biomarkers to detect prostate adenocarcinoma with high statistical indexes: *CDH2*, *CXCL12*, *CCL17*, *ESR1*, *FNI*, *IL1R1*, *HIF1A*, *HOTAIR*, *KRT18*, *PCA3*, *S100A4* and *VDR*. This panel can be used for differential diagnosis of adenocarcinoma and adenoma, and also for differentiation of adenocarcinomas by the stage (stages 1-2 and 3-4) and the Gleason score ($GS \leq 7$ and $GS > 7$). This comprehensive panel includes 3 sets of markers for stratification. Each of them has its own statistical parameters. The highest sensitivity, specificity, accuracy and OR characteristics of this biomarker set was observed upon distinguishing between adenomas and malignant prostate tumors (1.0, 0.8, 0.93, > 200 , respectively).

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

List of publications published on the topic of the dissertation:

1. Gordiyuk VV, Gerashchenko GV, Skrypkina IYa, Symonchuk OV, Pavlova TV, Ugryn DD, Manzhura EP, Vakulenko GO, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba

- VI. Identification of chromosome 3 epigenetic and genetic abnormalities and gene expression changes in ovarian cancer. *Biopolym Cell*. 2008; 24(4):323-332. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007B0>
2. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Skrypkinia IY, Kvasha SM, Kolesnik OO, Ugryn DD, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2009 Jul-Aug;81(4):81-7.
 3. Gerashchenko GV, Bogatyrova OO, Rudenko EE, Kondratov AG, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Vozianov OF, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of NKIRAS1 gene in human renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2010 Jul;32(2):71-5.
 4. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Kondratov AG, Kashuba VI. PPM1M as a potential tumor suppressor gene in human clear-cell renal carcinomas. *Factors of experimental evolution of organisms: collec of sci-paper*. 2011; 11:522-26.
 5. Kondratov AG, Stoliar LA, Kvasha SM, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Gerashchenko AV, Vozianov AF, Rynditch AV, Zabarovsky ER, Kashuba VI. Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas. *Mol Med Rep*. 2012 Feb;5(2):509-12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.681>.
 6. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk VV, Gerashchenko AV, Braga EA, Yenamandra SP, Lerman M, Senchenko VN, Zabarovsky E. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Oct 18;13(10):13352-77. <https://doi.org/10.3390/ijms131013352>.
 7. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Bogatyrova OO, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of *GPX1* and *GPX3* in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell*. 2013; 29(5):395-401. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00082F>

8. Gordiyuk VV, Kondratov AG, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Novel epigenetic markers of early epithelial tumor growth and prognosis. *Biopolym Cell*. 2013; 29(3):215-220. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00081B>
9. Rosenberg EE, Prudnikova TY, Gerashchenko GV, Grigorieva EV, Kashuba VI. Search for genes – potential markers of aggressiveness and metastasis for human prostate cancer. *Biopolym Cell*. 2013; 29(6):499-505. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000840>
10. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Comparative analysis of gene expression in normal and cancer human prostate cell lines. *Ukr.Biochem.J*. 2014; 86(2):119-28.
11. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. *PPM1M* and *PRICKLE2* are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell*. 2014; 30(3):229-233. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089A>
12. Rudenko EE, Lapska YV, Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Vikarchuk MV, Kashuba VI. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of *PPM1M* and *PRICKLE2* genes in human clear cell renal cell carcinomas. *Biopolym. Cell*. 2015; 31(1):29-33. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008C9>
13. Rudenko E, Kondratov O, Gerashchenko G, Lapska Y, Kravchenko S, Koliada O, Vozianov S, Zgonnyk Y, Kashuba V. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2015 Jun;37(2):105-10.
14. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Chashchina LI, Kazubskaya TP, Kondratieva TT, Lerman MI, Angeloni D, Braga EA, Kashuba VI. Tumor Suppressor Function of the *SEMA3B* Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 2015 May 11;10(5):e0123369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123369>.
15. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, Kudryavtseva AV, Beniaminov AD, Belova AA, Bondarenko YN, Danilets RO, Glukhov AI, Kondratov AG, Alexeyenko A, Alekseev BY, Klein G,

- Senchenko VN, Kashuba VI. Identification of Novel Epigenetic Markers of Prostate Cancer by NotI-Microarray Analysis. *Dis Markers*. 2015; 2015:241301. <https://doi.org/10.1155/2015/241301>.
16. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, Vitruk YV, Gryzodub OP, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol*. 2017 Jul; 39(2):131-137.
17. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Vozianov SO, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Detection of prostate specific ETS fusion transcripts in cancer samples. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(4):256-267. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000958>
18. Gerashchenko GV, Mankovska OS, Dmitriev AA, Mevs LV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(5):335-355. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00095E>
19. Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Chashchina LI, Gryzodub OP, Kashuba VI. A role of expression level of reference and investigated genes in prostate tumors for qPCR analysis. *Biopolym Cell*. 2018; 34(2):85-96. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000973>
20. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Molecular profiling of prostate tumors. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr*. 2018, 6:113-9. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.06.113>
21. Gerashchenko GV, Mevs LV, Chashchina LI, Pikul MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of steroid and peptide hormone receptors, metabolic enzymes and EMT-related genes in prostate tumors in relation to the presence of the TMPRSS2/ERG fusion. *Exp Oncol*. 2018 Jun;40(2):101-108.
22. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic alterations of human chromosome 3, investigated by NotI-microarrays in seven types of epithelial cancers. *Biopolym. Cell*. 2018; 34(4):303-312. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000983>

23. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Kononenko OA, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression pattern of genes associated with tumor microenvironment in prostate cancer. *Exp Oncol.* 2018 Dec;40(4):315-322.
24. Gerashchenko GV, Kononenko OA, Bondarenko YuM, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression patterns of genes that regulate lipid metabolism in prostate tumors. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(6):445-460. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000990>
25. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Mevs LV, Kashuba VI. PTEN-related changes of gene expression in human prostate cancer. *Factors of experimental evolution of organisms: collect of sci-paper.* 2018; 22:113-9.
26. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Development of gene expression panels to determine prostate cancer. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019; (1):100-6. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.100>
27. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Rosenberg EE, Bondarenko YuM, Kashuba EV, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors at mRNA and protein levels. *Biopolym. Cell.* 2019; 35(1):39-53.
28. Gerashchenko GV, Chashchina LI, Rynditch AV, Kashuba VI. The gene expression pattern as a tool for assessment of components of microenvironment and response to anti-cancer therapy of prostate tumors. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019; (4):86-93. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.04.086>.
29. Rosenberg E, Gerashchenko G, Kashuba V. Search for potential biomarkers of prostate cancer. X International scientific conference of students and PhD Students. Lviv. 8-11 april 2014; Collection of abstracts: 230-1.
30. Rosenberg E., Gerashchenko G, Kashuba V. Effect of D-Glucuronyl C5-Epimerase expression in prostate cancer cell lines. XI Український біохімічний конгрес 6-10 жовтня 2014 р., м.Київ, Україна. *Ukr Biochem J.* 2014; 86(5):29, Suppl. 2.
31. Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Snezhkina AV, Gerashchenko AV, Rudenko EE, Rosenberg EE, Puzanov GA, Puzanov MA, Alekseev BY, Senchenko VN, Kashuba VI. Comparative analysis of methylation/deletion patterns of chromosome 3 in different cancer types using NotI-microarrays. *FEBS EMBO*

- 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug - 4 Sept 2014. FEBS Journal. 2014; 281 (Suppl. 1):297-98. <https://doi.org/10.1111/febs.12919>
32. Rozenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. 2nd EACR Special Conference on Cancer Genomics, 28 June-01 July 2015, Cambridge, UK, EACR Conference Series. 2015:53.
33. Rozenberg EE, Kashuba VI, Gerashchenko GV, Litvinenko RA, Vitruk YuV, Stakhovsky EO. Expression of cancer-associated genes in prostate cancer. XIII-th Congress of Oncologists and Radiologists of Ukraine, may 26-28 2016, Kiev, Ukraine. Ukr.Radiol.J. 2016; Suppl.1:114-115.
34. Rozenberg EE, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Bondarenko YuN, Danilets RO, Kashuba VI. Prostate tumors characterization by NotI-microarrays. International scientific conference “Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer”, June 13-15, 2016, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol, 2016;38(2):138.
35. Rozenberg E, Gerashchenko G, Hryshchenko N, Lytvinenko N, Vitruk Yu, Gryzodub O, Stakhovsky E, Kashuba V. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” May 11, 2017 Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2017;39(2):157–160.
36. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rozenberg YE, Kashuba VI. TMRSS2-ERG dependent gene expression changes and possible fusion mechanism in prostate tumors. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, May15-16, Kyiv, Ukraine, Biopolym Cell. 2018;34(2):154.
37. Gerashchenko G, Rozenberg Y, Mevs L, Pikul M, Gryzodub O, Stakhovsky E, Kashuba V. Expression profiling of prostate tumor specific genes. Symposium and summer school “Fundamental principles of cancer biotherapy”, May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2018;40(2):158-9.
38. Gerashchenko GV, Kashuba VI. Molecular characteristics of an interaction between prostate tumor cells and the host organism. XI PARNAS Conference –

Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J. 2018;90 (Special Issue):73.

39. Gerashchenko G, Kashuba V. Molecular profiling of prostate tumors. “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2018”, 31 October-2 November, 2018, Prague, Czech Republic, Biological markers in fundamental and clinical medicine (collection of abstracts). 2018;2(2):25.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	32
ВСТУП.....	34
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	44
1.1. Молекулярні основи канцерогенезу епітелійних пухлин.....	44
1.1.1. Етіологія та патогенез онкологічних захворювань. Онкогенні властивості пухлинних клітин.....	44
1.1.2. Основні теорії та гіпотези канцерогенезу	47
1.1.3. Генетичні та епігенетичні аберації при канцерогенезі. Пухлино-асоційовані клітинні шляхи та гени. Онкогени та гени супресори росту пухлин.....	53
1.1.4. 3-я хромосома людини в канцерогенезі епітелійних пухлин.....	66
1.2. Метаболічні особливості та міжклітинні взаємодії у канцерогенезі.....	70
1.2.1. Метаболічне перепрограмування ракових клітин.....	70
1.2.2. Епітелійно-мезенхімний перехід у прогресії та метастазуванні пухлин.....	76
1.2.3. Характеристика пухлино-стромальних взаємодій.....	84
1.3. Сучасні підходи до пошуку молекулярних аберацій при канцерогенезі....	88
1.3.1. Широкомасштабний пошук генетичних та епігенетичних змін та порушення експресії генів у раках людини	88
1.3.2. Виявлення біомаркерів для діагностики та мішеней для таргетної терапії епітелійних пухлин	90
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	93
2.1. Хімічні реактиви та реагенти.....	93
2.2. Біологічні матеріали.....	94
2.2.1. Зразки тканин епітелійних пухлин.....	94
2.2.2. Клітинні лінії.....	94
2.3. Культивування клітинних ліній.....	94
2.4. Виділення геномної ДНК пухлин.....	95

2.5. NotI-мікропанелі	96
2.5.1. Приготування проб геномної ДНК.....	96
2.5.2. Підготування та гібридизація NotI-мікропанелей	98
2.6. Визначення статусу метилювання геномної ДНК.....	99
2.6.1 Бісульфітна обробка ДНК.....	99
2.6.2. Метилспецифічна ПЛР.....	100
2.6.3. Бісульфітне секвенування.....	100
2.6.3.1. ПЛР для ампліфікації фрагментів ДНК перед секвенуванням.....	100
2.6.3.2. Лігування продуктів ПЛР.....	101
2.6.3.3. Трансформація компетентних клітин <i>E. coli</i>	101
2.6.3.4. Культивування бактерій <i>E.coli</i>	101
2.6.3.5. Виділення плазмідної ДНК.....	102
2.6.3.6. Секвенування ДНК.....	102
2.7. Аналіз генетичних змін генів: кількості копій досліджуваних генів та втрати гетерозиготності (LOH).....	102
2.8. Виділення тотальної РНК.....	103
2.9. Електрофорез РНК в агарозному гелі.....	105
2.10. Синтез першого ланцюга кДНК.....	105
2.11. Кількісна ПЛР для визначення рівнів відносної експресії генів.....	107
2.12. Клітинні тести та дослідження на тваринах.....	107
2.12.1. Трансфекція і виділення стабільно трансфікованих клітинних клонів SEMA3B-U2020.....	107
2.12.2. Тест на формування колоній.....	107
2.12.3. Дослідження пухлино-супресорної активності гена SEMA3B in vivo.....	107
2.12.4. Імуногістохімічний аналіз пухлинної клітинної лінії U2020 і ангиогенезу пухлин імунодефіцитних мишей.....	108
2.13. Імуногістохімічний аналіз експресії білків в тканинах пухлин.....	108
2.14. Статистична обробка даних.....	109
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	111

3.1. Виявлення генетичних та епігенетичних порушень генів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах за допомогою NotI–мікропанелей.....	111
3.1.1. Результати гібридизації NotI–мікропанелей на зразках пухлин яєчника.....	112
3.1.2. Результати гібридизації NotI–мікропанелей на зразках пухлин товстого кишечника.....	115
3.1.3. Результати гібридизації NotI–мікропанелей на зразках пухлин передміхурової залози.....	117
3.1.4. Результати гібридизації NotI–мікропанелей на зразках пухлин молочної залози.....	118
3.1.5. Порівняльний аналіз виявлених за допомогою NotI–мікропанелей змін пухлино-асоційованих генів та потенційних генів супресорів росту пухлин у епітелійних пухлинах.....	121
3.2. Визначення типу змін генів (генетичних або епігенетичних) за даними NotI–мікропанелей та відкритих баз даних й встановлення рівнів відносної експресії досліджуваних генів	127
3.2.1. Аналіз статусу метилювання промоторних ділянок генів для виявлення епігенетичних порушень у епітелійних пухлинах.....	128
3.2.2. Встановлення генетичних аберацій генів з високим відсотком змін за даними NotI–мікропанелей у епітелійних пухлинах	138
3.2.3. Аналіз експресії пухлино-асоційованих генів з високим відсотком генетичних та/або епігенетичних аберацій у епітелійних пухлинах за даними NotI–мікропанелей та відкритих баз даних.....	142
3.2.4. Встановлення потенційної супресорної функції гена <i>SEMA3B</i> у пухлинах епітелійного походження <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	151
3.3. Встановлення змін експресії пухлино-асоційованих генів при канцерогенезі раку передміхурової залози у модельній системі <i>in vitro</i> та валідація даних на зразках пухлин.....	156

3.3.1. Вивчення експресії пухлино-асоційованих генів у клітинних лініях раку передміхурової залози для виявлення особливостей канцерогенезу, підвищення агресивності та метастазування пухлин.....	157
3.3.2. Встановлення рівнів відносної експресії відібраних диференційно-експресованих на клітинних лініях генів у зразках пухлин передміхурової залози людини.....	172
3.4. Встановлення особливостей експресії генів маркерів клітин пухлин та елементів строми раку передміхурової залози.....	180
3.4.1. Встановлення впливу рівнів експресії референсних та досліджуваних генів на показники відносної експресії у кПЛР аналізі.....	181
3.4.2. Встановлення та аналіз рівнів VE генів, що задіяні у епітелійно-мезенхімному переході клітин раку передміхурової залози, онкогенних гібридних транскриптів та довгих некодувальних РНК.....	188
3.4.3. Встановлення та аналіз рівнів VE генів, асоційованих з раком передміхурової залози: рецепторів стероїдних та білкових гормонів, факторів росту та простато-специфічних протеїнів.....	207
3.4.4. Встановлення та аналіз відносної рівнів експресії генів, що приймають участь у ліпідному обміні у пухлинах передміхурової залози.....	218
3.4.5. Встановлення та аналіз рівнів VE генів маркерів мікрооточення пухлин: пухлино-асоційованих фібробластів, пухлино-асоційованих макрофагів та імуно-асоційованих генів, як потенційних показників взаємодії пухлина-організм.....	227
3.5. Встановлення зв'язків між експресією пухлино-асоційованих генів на рівнях мРНК й білку та типів клітин, що їх експресують.....	249
3.6. Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози.....	263
3.6.1. Відбір генів для молекулярного профілювання пухлин передміхурової залози на основі результатів відносної експресії генів.....	263
3.6.2. Експресія гібридного транскрипта TMPRSS2-ERG як молекулярна характеристика пухлин передміхурової залози.....	270

3.6.3. Експресія <i>PTEN</i> як молекулярна характеристика пухлин передміхурової залози.....	282
3.6.4. Виявлення та аналіз молекулярних підтипів аденокарцином за показниками відносної експресії ЕМП-пов'язаних генів й простато-специфічних генів та генів, асоційованих з елементами стромы пухлин передміхурової залози.....	289
3.7. Визначення різних типів біомаркерів та створення панелей для діагностики онкологічних захворювань на основі порушень ДНК та експресії генів у пухлинах.....	305
3.7.1 Розробка панелей потенційних ДНК біомаркерів на основі генетичних та/або епігенетичних порушень для діагностики епітелійних новоутворень та прогнозу перебігу захворювання на рак на основі результатів NotI-мікропанелей.....	305
3.7.2. Потенційні фармакологічні біомаркери для встановлення діапазонів потенційної фармакологічної чутливості за показниками VE генів у раці передміхурової залози.....	309
3.7.3. Створення панелей експресійних РНК біомаркерів на основі даних відносної експресії генів у зразках раку передміхурової залози.....	313
3.7.3.1. Модифікація формату даних відносної експресії для розробки експресійних панелей біомаркерів на основі підходів машинного навчання...	313
3.7.3.2. Створення експресійних панелей для діагностики та розрізнення раку передміхурової залози.....	321
РОЗДІЛ IV. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	328
ВИСНОВКИ.....	353
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	356
ДОДАТКИ.....	461

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

А – аденоми ПЗ

ВГ (LOH) - втрата гетерозиготності (Loss of heterozygosity)

ВЕ- відносна експресія генів

ГС (TSG) – ген-супресор росту пухлини (tumor suppressor gene)

ГТ – гібридний транскрипт

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕМП – епітелійно-мезенхімний перехід

ІАГ – імуно-асоційовані гени

ІГХ – імуногістохімія

кДНК – комплентарна ДНК

кПЛР – кількісна ПЛР

КПХ – клініко-патологічні характеристики

мРНК – матрична РНК

МЕП- мезенхімно-епітелійний перехід

МСП – метил-специфічна ПЛР

мтДНК – мітохондріальна ДНК

нкРНК – некодувальна РНК

ОГ- онкоген

П – пухлини (аденокарциноми ПЗ)

ПАМ – пухлино-асоційовані макрофаги

ПАФ – пухлино-асоційовані фібробласти

ПЗ – передміхурова залоза

ПКМ- позаклітинний матрикс

ПЛР – полімерзано-ланцюгова реакція

ПСА – простато-специфічний антиген

РНК – рибонуклеїнова кислота

СГ – сума за шкалою (ступінь) Глісона

ТЛ - транслокація

УНТ – умовно-нормальні тканини

п.н. – пари нуклеотидів

к.р. – кількість разів

Ac – (Accuracy) точність

FDR – рівень хибнопозитивних результатів (false discovery rate)

lncRNA – довга некодувальна РНК

OR – (Odds Ratio) співвідношення ризиків

OXPPOS – окисне фосфорилування

SNP – однонуклеотидний поліморфізм

ТАЕ – трис-ацетатний буфер

ТВЕ – трис-боратний буфер

ТЕ – трис-ЕДТА розчин

ТСА – цикл трикарбонових кислот

Sn – (Sensitivity) чутливість

Sp – (Specificity) специфічність

ВСТУП

Актуальність роботи. У процесі злоякісної трансформації та прогресування злоякісних новоутворень клітини пухлин набувають певних онкогенних властивостей, що супроводжується змінами на молекулярному рівні організації (генетичному, епігенетичному, транскриптомному, протеомному, метаболомному) [1-3]. Ці порушення мають як пухлино-специфічний характер, так і загальний, притаманний багатьом видам епітелійних пухлин [4]. Основні канцерогенні характеристики набуваються клітинами пухлин завдяки певним механізмам у різному порядку появи [2].

Канцерогенез є багатостадійним процесом, який має наступні етапи розвитку: ініціація пухлин, промоція, прогресія та метастазування [5]. Дотепер достеменно невідомо, які зміни є високо-специфічними для кожного етапу, але з'ясовано, що як генетичні, епігенетичні зміни, так і порушення експресії багатьох генів відбуваються протягом усіх етапів захворювання [6, 7]. Але саме ця різноманітність молекулярних аберацій становить проблеми при діагностиці, лікуванні та прогнозі перебігу хвороби. Останніми роками завдяки розвитку сучасних методів молекулярно-біологічних досліджень (мікропанелі, FISH-аналіз, секвенування нового покоління) виявлено дуже багато порушень, які асоційовані з розвитком пухлин [8, 9]. Серед них - хромосомні перебудови, делеції, ампліфікації хромосом, локусів хромосом та генів, тисячі соматичних мутацій у генах, гіперметилування та гіпометилування промоторів генів, модифікації гістонів та зміна профілів експресії некодувальних РНК. Всі ці порушення впливають на експресію генів, що призводить до патологічних змін у тканинах та провокують набуття клітинами злоякісних властивостей [1, 2]. Згідно до сучасних уявлень у процесі канцерогенезу беруть участь сотні генів [6]. За їхніми властивостями активізувати чи інгібувати ріст пухлин їх умовно поділяють на онкогени та гени-супресори росту пухлин [10]. До того ж ці гени, як онкогени, так і гени супресори, відносяться до певних сигнальних шляхів клітини, що беруть участь у канцерогенезі [11]. Серед пухлино-асоційованих

клітинних шляхів, як дуже важливі, слід відмітити наступні: p53, Rb, TGF- β , VEGF, HIF1, PI3K-Akt, Jak-STAT, mTOR, cAMP, MAPK, PPAR, Notch, Wnt-b-catenin, Hedgehog, шляхи взаємодії з екстрацелюлярним матриксом та адгезії, апоптоз, шляхи андрогенового та естрогенового рецепторів, простагландинів, цитокінових рецепторів, кальцієвий сигнальний шлях та ін. [12-16]. Ці шляхи перетинаються, утворюючи складну біологічну мережу взаємодій. Причому у кожному типі пухлин, як і в індивідуальних пухлинах одного типу, комбінації активованих онкогенних шляхів та інактивованих генів-супресорів росту пухлин відрізняються [17,18]. Це віддзеркалюється на чутливості пухлин до різних видів лікування, швидкості прогресії та метастазування, що нагально потребує визначення молекулярних особливостей пухлин у клініці.

3-я хромосома людини є однією з найбільш широко досліджуваних за різних видах раку. Завдяки методам каріотипування, аналізу втрати алелей, методам порівняльної гібридизації ДНК встановлено втрату частин 3-ої хромосоми людини у низці спорадичних злоякісних пухлин [19-21]. Делеції, що відбуваються у геномі пухлинних клітин, вважаються першою ознакою можливого розташування генів-супресорів пухлин у цих ділянках хромосом [22]. Ідентифікувати потенційні гени супресори росту пухлин вдалося після успішного фізичного картування 3-ої хромосоми людини за допомогою технології NotI-пов'язаних та стрибаючих клонів [23-28]. Встановлено, що гени 3-ої хромосоми людини грають важливу роль у канцерогенезі епітелійних пухлин різних локалізацій [29-33]. Тому, виявлення молекулярних змін в структурі та функції цих генів за умов канцерогенезу вкрай важливе для більш глибокого розкриття механізмів пухлинного росту і пошуку мішеней для терапії. Новітня технологія NotI-мікропанелей є перспективною для скринінга пухлино-асоційованих порушень для пошуку пухлино-специфічних змін та розкриття механізмів прогресії пухлин, маркерів для діагностики та прогнозу перебігу захворювання.

Набуття трансформованими клітинами онкогенних ознак й посилення агресивності ракових клітин та епітелійно-мезенхімний перехід за прогресії та

метастазування пухлин неможливе без перепрограмування клітинного метаболізму. Це спричинено описаними вище генетичними й епігенетичними порушеннями та активацією протоонкогенів й пов'язаних з ними онкогенних шляхів з одночасною втратою регуляторних функцій генів супресорів росту пухлин [34-38]. У перепрограмуванні метаболізму трансформованих клітин на користь неконтрольованого росту задіяні такі онкогени, як *MYC*, *BRAF*, *KRAS* *PI3K* та ін. [39-41].

Сучасні дані свідчать про важливість пухлино-стромальних взаємодій, які представляють собою взаємний вплив ракових та супутніх стромальних клітин та їхню взаємодію з позаклітинним матриксом, що є атрибутом взаємодій пухлина-організм в цілому [42-44]. Реактивна пухлинна строма складається з багатьох типів клітин, зокрема фібробластів та пухлино-асоційованих фібробластів, макрофагів та пухлино-асоційованих макрофагів, мезенхімних стовбурових клітин, ендотелійних, клітин імунної системи тощо [42, 45]. Взаємодії генетично змінених пухлинних клітин і позаклітинного матриксу, з одного боку, і реактивних стромальних клітин, з іншого боку, суттєво контролюють більшість аспектів прогресування пухлин, таких як ЕМП, міграцію, інвазію, утворення метастазів, неоваскуляризацію, апоптоз і стійкість до хіміотерапії [45-47]. Такі впливи та взаємодії опосередковуються хемокінами, розчинними факторами, ферментами, зокрема металопротеїназами, факторами росту (TGF β , PDGF, VEGF, HGF EGF, FGFs), позаклітинними везикулами (зокрема екзосомами) і некодувальними РНК [48-51]. Нажаль, ні в Україні, ні в світі ще не створено повноцінних діагностикумів для оцінки стану строми пухлин, що актуально для прогнозу захворювання та підбору терапії.

Складність механізмів канцерогенезу унеможливорює пошук однієї мішені для терапії та одного біомаркера для діагностики раку, і порушує вельми нагальне питання про встановлення індивідуальних молекулярних особливостей пухлин (генетичних, епігенетичних, експресійних), їхнього мікрооточення та стану і можливостей організму у боротьбі з раком, що є реальною задачею, яка відповідає сучасному рівневі розвитку молекулярної

біології та генетики. Це є актуальним для розробки точної діагностики та прогнозування, пошуку індивідуального ефективного лікування, що є основою персоналізованої медицини, засади якої тільки створюються в світі й Україні.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках бюджетних наукових проектів відділу молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Ідентифікація генів-супресорів, картованих на 3-й хромосомі для створення маркерів – ключових для певних видів злоякісних пухлин епітелійного походження» (2007-2011 р., державний реєстраційний номер 0107U000337), та «Дослідження властивостей молекулярно-генетичних маркерів як основи для діагностики онкологічних патологій» (2007-2009 р., державний реєстраційний номер 0107U0004941), «Вивчення генетичних та епігенетичних змін в злоякісних пухлинах епітелійного походження» (2011-2015 р., державний реєстраційний номер 0110U000691), «Ідентифікація нових біомаркерів для діагностики злоякісних новоутворень та розробка підходів до генотерапії пухлин у модельних системах» (2016-2020 р., державний реєстраційний номер 0115U003742), цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій». Проект «Ідентифікація молекулярно-генетичних маркерів для діагностики злоякісних новоутворень епітелійного походження» (2010-2014 р., державний реєстраційний номер 0110U004744, та 2015 р. № 41/146), цільового тематичного конкурсу Ф46 ДФФД науково-навчального центру «Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології» - «Макромолекули та їх комплекси в реалізації генетичної інформації» (2011-2012 р., державний реєстраційний номер №F46.1/011) та за підтримки гранту Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації (державний реєстраційний номер № 0111U005988).

Програма «Нанотехнології та наноматеріали» Проект «Функціональні біонаноматеріали для медичної діагностики онкологічних захворювань» (2010-2014 р., державний реєстраційний номер 0110U004646).

Державна цільова науково-технічна програма розроблення новітніх технологій створення вітчизняних лікарських засобів для забезпечення охорони здоров'я людини та задоволення потреб ветеринарної медицини «Створення та введення в експлуатацію лабораторного модуля для дизайну та застосування мікрочипів» (2012 р., державний реєстраційний номер 0112U007434).

Програма «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства" «Гени-супресори пухлинного росту та пухлино-асоційовані гени - як потенційні маркери для діагностики та терапії злоякісних новоутворень» (2015-2019 р., державний реєстраційний номер 0115U002950).

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

Завдання:

1. Виявити та провести порівняльний аналіз генетичних та епігенетичних порушень генів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах за допомогою NotI-мікропанелей.
2. Встановити тип змін (генетичний або епігенетичний) генів та/або локусів, що мають зміни за даними NotI-мікропанелей.
3. Визначити рівні відносної експресії генів, що мають генетичні та/або епігенетичні зміни за даними NotI-мікропанелей.
4. Встановити пухлино-супресорну функцію гена *SEMA3B* (Chr 3p21.31) у пухлинах епітелійного походження *in vitro* та *in vivo*.
5. Дослідити рівні експресії пухлино-асоційованих генів у клітинних лініях раку передміхурової залози для виявлення особливостей канцерогенезу, потенційних маркерів агресивності і метастазування пухлин.
6. Визначити диференційно-експресовані гени, що асоційовані з характеристиками пухлинних клітин передміхурової залози.

7. Виявити диференційно-експресовані гени-маркери елементів строми пухлин передміхурової залози.
8. Встановити клінічно значущі експресійні характеристики і кореляції генів для молекулярного профілювання пухлин передміхурової залози та виявити молекулярні підтипи на основі експресійних патернів пухлино-асоційованих генів та маркерів елементів строми пухлин.
9. Провести аналіз та підбір наборів потенційних ДНК біомаркерів для діагностики епітелійних новоутворень і їх агресивності на основі результатів NotI-мікропанелей.
10. Виявити потенційні експресійні фармакологічні біомаркери та розробити набори для діагностики раку передміхурової залози.

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

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

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

Наукова новизна отриманих результатів. За допомогою технології широкомасштабного скринінгу NotI-мікрочипів виявлено генетичні та/або епігенетичні зміни десятків генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах яєчника, кишечника, передміхурової та молочної залоз, та підтверджено іншими незалежними методами встановлені генетичні порушення - делеції (втрата гетерозиготності, аналіз копій генів), епігенетичні порушення – метилювання промоторів (метил-специфічна ПЛР, бісульфітне

секвенування), зміна експресії генів на рівні мРНК (нозерн-блот гібридизація, ПЛР у реальному часі). Проведено порівняльний аналіз змін пухлино-асоційованих генів та потенційних генів супресорів росту пухлин в зразках епітелійних пухлин та проведено підбір панелей потенційних біомаркерів для діагностики епітелійних новоутворень, зокрема раку яєчника та передміхурової залози. У досліджах *in vitro* та *in vivo* вперше доведена пухлино-супресивна роль гена *SEMA3B* у канцерогенезі на прикладі пухлин легені.

Вивчення змін експресії генів (біля 200 генів) як на клітинних лініях раку передміхурової залози, так і на зразках хірургічно видалених пухлин дозволило виявити диференційно-експресовані гени у клітинних лініях з різним потенціалом агресивності та метастазування, серед яких гени *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1*, *EPDR1* і *FOS*, а також певні особливості пухлино-стромальних характеристик пухлин передміхурової залози, які є одними з найбільш гетерогенних видів злоякісних новоутворень. Отримані дані свідчать про біологічно-детермінований характер змін експресії, що проявляється у високому рівні дисперсії цього показника у пухлинах. Це дозволило вперше виявити молекулярні характеристики зразків пухлин та профілі експресії як простато-специфічних генів, серед яких *AR*, *CDH1*, *KRT18*, *ESR1*, *GCR*, *PRLR*, *VDR*, *SRD5A2*, так і генів-маркерів стромальних елементів раку передміхурової залози, зокрема *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, *CTLA4*, *IL1R1*. Вперше встановлено молекулярні підтипи раку передміхурової залози, що мають різні активовані онкогенні шляхи та інактивовані гени-супресори. Модифіковано алгоритм для розробки експресійних наборів онкомаркерів на базі MDR-аналізу та проаналізовано потенційні діапазони чутливості до таргетної терапії генів-мішеней пухлин передміхурової залози (*AR*, *FASN*, *LDLR*, *HMGCR*, *COX2*, *PTEN*, і *CTLA4*) на основі змін відносної експресії генів.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлення за допомогою NotI-мікропанелей та підтвердження іншими методами генетичних та епігенетичних порушень низки генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у

епітелійних пухлинах призвело до ідентифікації нових потенційних біомаркерів та розробці панелей для діагностики та розрізнення пухлин яєчника та передміхурової залози. Встановлення епігенетичного характеру порушень для низки генів відкриває можливість розробки наборів біомаркерів у біологічних рідинах для ранньої діагностики онкологічних захворювань.

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

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

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

Усі дослідження виконано за безпосередньої участі або під керівництвом здобувача. Основні результати по підтвердженню та аналізу результатів NotI-мікропанелей, експресії пухлино-асоційованих генів та генів-маркерів елементів строми у клітинних лініях та зразках пухлин, статистичний аналіз результатів та виявлення молекулярних підтипів, діапазонів чутливості,

модифікація даних для аналізу методом машинного навчання та розробка експресійних панелей біомаркерів отримані особисто автором.

Підготовку проб, гібридизацію та аналіз NotI-мікропанелей проведено у співпраці з професором В.І. Кашубою [52] та к.б.н. В.В. Гордіюком [53]. Встановлення метилювання низки генів за даними NotI-мікропанелей виконано за участі к.б.н. О.Г. Кондратова [54], ідентифікація генетичних порушень низки генів 3-ої хромосоми проведено разом з к.б.н. Є.Є. Руденко [55], дослідження експресії генів на клітинних лініях та NotI-мікропанелі на зразках раку передміхурової залози й підтвердження змін відносної експресії на клінічних зразках здійснено разом з к.б.н. Є.Е. Розенберг [56]. Збір зразків пухлин передміхурової залози та виділення з них тотальної РНК проводилося разом із к.б.н. Є.Е. Розенберг та Л.В. Мевс. Імуногістохімічні дослідження проведено спільно із завідувачем відділу молекулярної та клітинної патобіології ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України, д.б.н. О.В. Кашубою. Автор висловлює подяку усім співавторам за плідну співпрацю. Слова щирої вдячності автор висловлює член-кореспонденту НАН України, д.б.н., професору А.В. Риндич за допомогу у виборі теми дослідження, освоєнні низки методів та аналіз результатів. Щиру подяку автор висловлює науковому консультанту д.б.н., професору В.І. Кашубі за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні результатів та підготовці наукових публікацій.

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

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

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації – 309 сторінок машинописного тексту. Робота містить 78 рисунків, 79 таблиць, 25 додатків. Перелік використаної літератури охоплює 951 джерело.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Молекулярні основи канцерогенезу епітелійних пухлин

1.1.1. Етіологія та патогенез онкологічних захворювань. Онкогенні властивості пухлинних клітин. Онкологічні захворювання людини – це різнорідна група багатофакторних високо летальних хвороб людини, які вражають всі органи та системи організму людини. Вони мають як специфічні, так і загальні прояви/ознаки, є локалізованими, або розповсюдженими по органам та тканинам, мають стадії, які характеризують ступінь тяжкості захворювання та розповсюдження по організму. Пухлини мають доброякісний або злоякісний фенотипи, які визначають летальність впливу на організм в цілому [57-59].

Всі онкологічні захворювання класифікуються згідно Міжнародної класифікації онкологічних захворювань третього видання (*ICD-O-3*), яка є спеціальним тематичним розширенням Міжнародної класифікації хвороб. Вона має дві вісі ознак: топографія та морфологія. Топографія характеризує місце розташування пухлин в організмі людини, тоді як вісь морфологія описує стан та структуру пухлин [60].

Останні дані 2018 року GLOBOCAN 2018, розробленого за сприянням Міжнародного агентства з дослідження ракових захворювань свідчать про 18,1 мільйони нових виявлених випадків захворювання на рак у світі [61]. Вони акцентують увагу на мінливості даних у різних регіонах. Одна з найбільш важливих характеристик захворювання та ефективності або неефективності лікування є смертність людей від цього захворювання. Так за даними GLOBOCAN 2018 від раку померло 9,6 мільйонів осіб у світі [62]. Розподіл між чоловіками та жінками за видами раку є різним, але найбільш летальним

вважається рак легенів, від якого у 2018 році померло 18,4% від загальних випадків смерті від онкологічних захворювань для обох статей. Крім того, цей вид раку є й найчастіше діагностованим (11,6% від усіх випадків захворювання). Наступні високо летальні види раку є рак молочної залози у жінок та рак передміхурової залози у чоловіків, та рак прямої кишки які складають 11,6%, 7,6% та 6,1% від виявлених випадків. Пухлини молочної залози серед жінок є найбільш високо летальним видом раку.

Згідно даних ВООЗ усі країни світу поділені умовно на три групи згідно рівня економічного розвитку. У цих групах різний «набір» основних смертельних хвороб. Так у низько розвинених країнах основними причинами смерті людей є інфекційні хвороби, нещасні випадки, тоді як онкологічні хвороби на перші місця виходять у економічно розвинених країнах. Причому у певних регіонах є свої особливості за видами онкологічних хвороб [61].

За даними Національного канцер-реєстру України (НКР) [63] в 2016 році за уточненою інформацією зареєстровано 135714 нових випадків захворювання на рак. Смертність від цих захворювань у 2016 році склала 66067 осіб. Найвищі показники смертності були зареєстровані у Дніпропетровській, Кіровоградській, Херсонській та Чернівецькій областях. Слід відмітити, що у структурі смертності від раку серед чоловіків перші рангові місця посіли злоякісні пухлини легені, шлунка, передміхурової залози, колоректальний рак, що становило 54% від усіх смертельних випадків від онкологічних захворювань у 2016 році серед чоловіків. У жінок ці рангові місця посіли злоякісні новоутворення молочної залози, шлунка, колоректальний рак і рак яєчника, що становить 49,3% від усіх смертельних випадків від онкологічних захворювань серед жінок.

Епітелійні пухлини становлять більш ніж 90% від усіх онкологічних новоутворень, які діагностуються часто на пізніх стадіях, лікування хворих є дорогим та часом не ефективним з низьким рівнем 5-ти річного виживання. Злоякісні епітелійні пухлини, або раки є найбільш поширеними серед всіх онкологічних захворювань [57, 62].

Основними онкогенними групами чинників за даними ВООЗ є:

Фізичні (ультрафіолет, іонізуюче випромінювання)

Хімічні (канцерогени у їжі, повітрі, воді)

Біологічні (віруси, бактерії, паразити)

Біля однієї третини всіх випадків смерті від раку обумовлені п'ятьма провідними особливостями стилю життя, а саме поведінковими і дієтичними ризиками: високий індекс маси тіла, низьке споживання фруктів і овочів, відсутність фізичної активності, вживання тютюну і вживання алкоголю [58, 61].

Кожен вид раку має власні комбінації факторів ризику для розвитку захворювання, але існують загальні фактори ризику, серед яких найбільш вивченими є: спадкова схильність, вік, етнічна приналежність, інфекційні агенти, вживання алкоголю та тютюну, хронічне запалення, дієта, хімічні канцерогени, гормональні та репродуктивні фактори, імуносупресивні стани, радіація, ультрафіолет, низька фізична активність та інші [64]. Так, наприклад для розвитку раку легені вживання тютюну має критичне значення [65], тоді як для раку шкіри критичним фактором ризику є ультрафіолетове опромінення [66], а для розвитку раку передміхурової залози важливу роль поряд з іншими грають етнічні фактори та вік [67].

Відомо, що в процесі злоякісної трансформації та прогресування злоякісних новоутворень відбувається надбання клітинами пухлин певних онкогенних властивостей, що супроводжується незворотними змінами на молекулярному рівні організації ракових клітин (генетичному, епігенетичному, транскриптомному, протеомному, метаболомному). Ці порушення мають як пухлиноспецифічний характер, так і загальний для багатьох видів епітелійних пухлин [4]. Згідно сучасних уявлень злоякісні пухлини мають 6 характерних біологічних ознак, які були описані Д. Ханаханом та Р. Вайнбергом у 2000 р. [1] та додані пізніше у 2011 р. дві нові ознаки й дві провідні характеристики [2]. Шість основних ознак – це підтримка проліферативної активності, ухиляння від інгібування росту, протидія загибелі клітин, забезпечення реплікативного

безсмертя, індукція ангиогенезу й активація інвазії та метастазування. Додатковими ознаками є дерегуляція клітинної енергетики й уникання імунного знищення. Двома провідними характеристиками є геномна нестабільність й мутації та пухлино- підтримуюче запалення. Основні ознаки та характеристики набуваються пухлинами за допомогою різних механізмів та у різному порядку їх появи у різних типах пухлин [2]. Крім того, поява певних генетичних порушень, наприклад інактивація p53, може надавати декілька пухлинних ознак одночасно, тоді як при відсутності даних генетичних порушень пухлини набувають цих ознак завдяки більшій кількості порушень за більш тривалий час [1].

1.1.2. Основні теорії та гіпотези канцерогенезу. На даний час відомо багато теорій та парадигм виникнення та розвитку пухлин, або канцерогенезу. Найбільш поширеними та відомими є 5 типів моделей (таблиця 1.1): 1 модель – мутаційна. Основоположником є німецький біолог Теодор Бовері у 1914 році. Розвивали цю теорію Герман Мюллер, Альфред Кнудсон, Роберт Уейнберг, Берт Фогельштейн, Ерик Ферон та інші впродовж майже століття [68]. Основна ідея полягає в тому, що мутації геномної ДНК у клітинах є основною особливістю канцерогенезу, що веде до появи злоякісного фенотипу [69, 70]. Рання математична модель Армітаж П. описує збільшення частоти появи мутацій з віком, що призводить до порушень, необхідних для виникнення раку. Серед факторів, що спричиняють появу та накопичення мутацій пізніше виявлено хімічні, біологічні та вірусні канцерогени [71-73].

Друга модель, «геномної нестабільності», характеризує два напрямки досліджень, пов'язаних зі спадковими видами раку: ретинобластома та сімейний тип раку товстого кишечника. Перша модель була запропонована Кнудсоном [74, 75] для ретинобластоми, як теорія двох ударів.

На той час виявлено новий тип генів, що є критичними для появи та розвитку пухлин – гени супресори росту пухлин. Для розвитку ретинобластоми необхідним чинником є інактивація гена-супресора *RB1*. Згідно теорії Кнудсона при спадковому типі раку інактивація одного алеля гена *RB1* є вродженою

Таблиця 1.1.

Основні особливості відомих моделей канцерогенезу [68] з доповненнями

Характеристики моделей	Мутаційна модель (1)	Модель геномної нестабільності (2)	Негенотоксична модель (3)	Дарвінівська модель (4)	Модель тканинної організації (5)
Онкогенні чинники	Канцерогени	Спадкові фактори, геномна нестабільність	Клональна експансія/епігенетичні порушення	Клональна експансія/клітинний відбір	Мікрооточення, порушення стійкого стану диференційованих тканин
Приклади факторів/специфічні раки	Хімічні та вірусні канцерогени	Ретинобластома, рак кишечника	Дієта, гормони, хімічні впливи	Мутагени, селектогени хіміотерапія	Фокальні проліферативні порушення
Механізми	Порушення геномної ДНК, мутації, активація онкогенів	Хромосомна та мікросателітна нестабільність репарація неспарених основ, інактивація генів-супресорів	Метилування та ацетилювання гістонів	Набуття селективних переваг	Метаплазія на стику двох різних морфостатичних полів, морфостати
Математична модель	Армітаж-Долл	Кнудсон	Мулгавкар	Новак	Бейкер

(гермінальною), а другого алеля гена *RB1* – соматичною (мутація/інактивація), тоді як для не спадкових раків обидві мутації/інактивації алелів *RB1* є соматичними [74, 76]. Друга модель стосується сімейного раку товстого кишечника, що пов'язано не тільки з порушенням гена-супресора *APC*, але й з появою мікросателітної нестабільності [77], та участі генів репарації помилково спарених нуклеотидів (mismatch-repair genes), таких як *BRCA1*, *MGMT* й *MLH1* як у сімейних, так і спорадичних типах раку товстого кишечника [78, 79]. К. Р. Хо та Б. Вогельштейн вважали, що для розвитку злоякісних пухлин необхідні наступні порушення: мутаційна активація онкогенів у парі з інактивацією генів супресорів, мутації як найменш чотирьох-п'яти генів та/або генетичні порушення у генах, пов'язаних з розвитком пухлин [80].

Більш пізньою є «негенотоксична модель». Вона акцентує увагу на важливих модуляторах ризику розвитку раку, таких як гормони, дієта, інсулінорезистентність, ожиріння, хімічні речовини тощо [81-83]. На перший погляд ці впливи не пов'язані зі структурними змінами ДНК, а скоріше впливають через функціональні аберації, включаючи епігенетичні порушення. Математичною моделлю цієї теорії є двоетапна модель клональної експансії С. Мулгавкар [84]. Згідно цієї моделі нормальні стовбурові клітини можуть бути перетворені при першій стохастичній події (перша мутація) у проміжні форми клітин, які при наступних поділах дають теж проміжні клітини, які або гинуть, або диференціюються. Крім того ці проміжні клітини можуть давати ще такі ж проміжні, частина яких після другої стохастичної події (мутації) може трансформуватись у злоякісні клітини. Ці злоякісні клітини через певний проміжок часу (затримки) можуть перетворюватись у пухлину.

Частково з цією моделлю перекривається так звана Дарвінівська модель канцерогенезу. Вона базується на математичній моделі М. Новака і постулює, що клітинний відбір на додаток до отриманих соматичних мутацій є рушійною силою процесу канцерогенезу [85, 86]. Існує думка, що попередні три квазі-механічні типи моделей: мультистадійна модель Армитажа та Дола [69, 70], дво-мутаційна модель Мулгавкара, Венсона й Кнудсона (МВК) [87, 88], мультистадійна узагальнююча МВК модель Літтла [89] та узагальнені на їх основі моделі, що враховують ефекти трансмісивної геномної нестабільності [90-92], базуються насамперед на гіпотезі Дарвінівської соматичної еволюції [93]. Тоді як дійсно еволюційний підхід до раку та його функції в популяції запропоновано А. Ліхтенштейном [94]. Канцерогенез розглядається як еволюційно консервативне явище - програмована смерть організму. Передбачається, що рак має важливу функцію альтруїстичної природи: як посередник негативного відбору, він служить для збереження цілісності генофонду видів і опосередковує його еволюційне пристосування [95].

На основі моделі клональної еволюції та припущення, що переважна більшість пухлинних клітин здатні розповсюджувати і стимулювати ріст

пухлини, мета лікування раку традиційно полягала у вбивстві всіх ракових клітин. Ця теорія нещодавно була оскаржена гіпотезою ракових стовбурових клітин, яка постулює існування рідкісної популяції пухлинних клітин, що мають характеристики стовбурових клітин та відповідають за ріст пухлини, резистентність та рецидиви. Докази передбачення ракових стовбурових клітин описані для раку молочної залози, легені, передміхурової та підшлункової залози, кишечника, печінки й головного мозку [96, 97].

П'ята модель «тканинної організації» найбільш пізня. Вона фокусується на мікрооточенні пухлин. Модель має два аспекти базових досліджень: перший – мікросередовище [98, 99], другий – базується на теорії морфостатів/морфостазу [100-102]. По аналогії з ембріональним розвитком, де морфогенетичні поля організують морфологію тканин, морфостатичні поля підтримують нормальну поведінку клітин та мікроархітектуру тканин у дорослому організмі. Найбільш відомою ознакою раку є порушення мікроархітектури тканин. Причому поява раку більш ймовірна між різними морфостатичними полями або при порушенні морфостатичного впливу (метаплазіях) [101-103].

Поява вогнищевих проліферативних уражень може виступати як попередник розвитку раку. Стає все більш очевидним, що виникнення таких уражень не є клітинно-автономним явищем, але залежить від мікроекологічних сигналів, отриманих від оточуючих клітин та тканин [98]. Як результат є зміна тканинної архітектури, що перетворюється на виникнення унікального мікросередовища пухлини всередині цих ушкоджень, пов'язаних зі зміненими кровоносними судинами або кровопостачанням, що, в свою чергу, може спричинити біохімічні та метаболічні зміни, що сприяють прогресуванню пухлини [99].

Чинниками та сигналами, що призводять до порушення тканинної архітектури є морфостати, які дифундують через тканину для визначення фенотипу клітин та підтримки архітектури тканин і є показниками порушення взаємодій між стромою та епітелієм [103]. Морфостати найбільш вірогідно

походять зі стовбурових і стромальних клітин, що оточують епітелій [101]. Комп'ютерне моделювання потенційного впливу морфостатів на оновлення клітин та мікроархітектуру тканин показало, що зрив морфостатичного градієнта в стромі, без мутацій в епітелії, може генерувати попередників епітелійного раку [103]. Ця математична модель узгоджується з можливістю того, що генетичні та епігенетичні зміни пухлин можуть виникнути після утворення клону ненормальних клітин, який виник внаслідок провалу морфостатичного контролю мікроархітектури зрілих тканин [103]. В рамках цієї моделі мікросередовище пухлини не може вважатися просто схожим на новий фактор, який слід додати до вже довгого списку сигнальних факторів. Мікрооточення являє собою фізико-біохімічну підтримку морфогенетичного поля, що веде епітелійні клітини до диференціювання та перетворення фенотипу, згідно з певними правилами, зрозумілими за допомогою системно-біологічного підходу [104].

Впритул до моделі тканинної організації примикають моделі запалення [68]. Широко відомий факт, що хронічне запалення створює передумови розвитку злоякісних новоутворень [105-109] та підтримує прогресування пухлин [110, 111] не є лише гіпотезою, а становить теоретично й експериментально підтверджену модель, на яку останнім часом звертають увагу не лише клініцисти, а й фармакологи [112]. Серед факторів, що опосередковують процеси запалення передують оксидативний стрес [113, 114] й гіпоксія [110, 115, 116], порушення мікробіому [105, 117, 118] й онкогенні віруси [108, 119, 120], імунні розлади [121-123] й патологічне старіння [125-127], особливості стилю життя людини, серед яких дієта, фізична активність, хронічні емоційні стреси [128-133]. Більшість з цих факторів мають й власні механізми впливу на розвиток пухлин поза рамками моделі запалення.

У літературі часто порівнюють та протиставляють два типи моделей, які вважаються основними, але несумісними – це модель соматичних мутацій (МСМ) та тканинної організації (ТО) [134, 135], які ми щойно розглядали. Одні автори на базі перевірки двох моделей МСМ та ТО на підставі гносеологічних і

експериментальних доказів, показали, що ТО переконливо пояснює канцерогенез, якщо враховується еволюційний контекст і пропонують відмовитись від застарілої гіпотези соматичних мутацій [136, 137]. Є приводи для критики МСМ як теорії, що описує більш пізні події канцерогенезу, а не причини виникнення [138]. Тоді як інші автори вважають, що МСМ адекватно описує появу та прояви канцерогенезу, як і ТО, бо описують два різні і сумісні біологічні шляхи канцерогенезу [135]. Ця точка зору узгоджується з існуванням інтегративних підходів, і припускає, що вони мають вищу епістемічну цінність, ніж дві окремі теорії [139].

Можна виявити експериментальні докази того, що підтримують і суперечать більшості загальновідомих теорій, але немає єдиної теорії, яка б об'єднала всі ці дані та ідеї. Численні автори виявили потребу в розробці системного підходу до раку, де будуть примирені та враховані вже відомі моделі [140-143]. З включенням концепцій та понять "виникнення", "системи", "термодинаміка" та "хаос", "функціональна одиниця тканини" розроблено єдину інтегровану модель "загальні принципи виникнення канцерогенезу", що дозволило існуючим теоріям стати сумісними як альтернативні [144]. Авторами запропоновано дванадцять принципів, що визначають "рамки виникнення карциногенезу". Принципи 1-10 - містять основні поняття, на яких побудована система, принципи та умови виникнення пухлини як нової системи. Принцип 11 стосується основи прогресування раку. Принцип 12 стосується застосування рамки до трансляційних досліджень. Рамки виникнення карциногенезу, як вважають автори, зближують сучасні парадигми, концепції та докази стосовно канцерогенезу в єдину структуру, яка включає раніше несумісні точки зору та ідеї, наприклад МСМ, ТО, еволюційну модель, модель запалення та інші [144].

У цьому підрозділі розглянуто найбільш відомі та поширені теорії та моделі канцерогенезу. Вони є основою для розуміння механізмів виникнення раку, а також слугують парадигмами для більш глибокого вивчення та дослідження різних видів цієї хвороби, способів ранньої діагностики, довгострокового прогнозу, засобів профілактики та розробки нових методів

лікування. Але, нажаль, клініцисти рідко їх беруть до уваги, керуючись клінічними проявами та розробленими протоколами лікування. Незалежно від того, яка модель є дійсно вірною, при розвитку раку спостерігаються всі описані в різних моделях аберації, що охоплюють геномні, епігеномні, транскриптомні, протеомні, метаболомні, мікробіомні, загальносистемні порушення. Виявлення особливостей порушення у конкретному організмі людини при діагностуванні певного виду раку та встановлення його молекулярних властивостей є основою для персоналізованої медицини та розроблення підходів таргетної терапії.

1.1.3. Генетичні та епігенетичні аберації при канцерогенезі. Пухлино-асоційовані клітинні шляхи та гени. Онкогени та гени супресори росту пухлин. Канцерогенез епітелійних пухлин, має наступні етапи розвитку: ініціація пухлин, промоція, прогресія та метастазування [5]. Достеменно невідомо які зміни є високо специфічними для кожного етапу, але відомо, що як генетичні, епігенетичні, так і порушення експресії багатьох генів та білків спостерігаються впродовж всіх етапів захворювання. За останні роки завдяки розвитку сучасних методів молекулярно-біологічних досліджень (мікропанелі, FISH-аналіз, секвенування нового покоління) виявлено дуже багато порушень, які асоційовані з розвитком пухлин. Серед них хромосомні перебудови, делеції, ампліфікації хромосом, втрата гетерозиготності, тисячі соматичних мутацій у генах, делеції та ампліфікації генів, гіперметилування та гіпометилування промоторів генів, модифікації гістонів та зміна профілів експресії некодувальних РНК.

Всі ці порушення впливають на експресію генів, що призводить до патологічних змін у функціонуванні клітинних процесів й клітинного метаболізму та провокує набуття клітинами онкогенних властивостей [1, 2]. Згідно сучасним уявленням у процесі канцерогенезу беруть участь сотні генів [6]. За їх властивостями активізувати чи інгібувати ріст пухлин їх умовно поділяють на онкогени та гени-супресори росту пухлин [10]. До того ж ці гени, як онкогени, так і гени супресори, відносяться до певних сигнальних шляхів

клітини, що приймають участь у канцерогенезі [11]. Серед пухлино-асоційованих клітинних шляхів слід відмітити наступні, як дуже важливі: p53, Rb, TGF- β , VEGF, HIF1, PI3K-Akt, Jak-STAT, mTOR, cAMP, MAPK, PPAR, Notch, Wnt-b-catenin, Hedgehog, шляхи взаємодії з екстрацелюлярним матриксом та адгезії, апоптоз, шляхи андрогенового та естрогенового рецепторів, простагландинів, цитокінових рецепторів, кальцієвий сигнальний шлях та інші [12-16]. Ці шляхи перетинаються, утворюючи складну біологічну сітку взаємодій. Крім того у кожному типі пухлин, як і в індивідуальних пухлинах комбінації активованих онкогенних шляхів та інактивованих генів-супресорів росту пухлин будуть відрізнятися [17, 18].

Відомо, що раки людини мають множинні соматичні генетичні зміни, викликані точковими мутаціями, рекомбінаціями, ампліфікаціями та / або делеціями. До генів з генетичними порушеннями відносяться як онкогени, так і гени супресори, гени контролю репарації ДНК й гени, які прискорюють проліферацію і метастазування [7, 145, 146]. У таблиці 1.2 наведені найбільш поширені та відомі генетичні зміни у низці злоякісних епітелійних пухлин людини.

Як свідчать дані таблиці 1.2 а-г у процесі канцерогенезу відбуваються численні генетичні порушення як на рівні хромосом людини, так і на рівні геномної ДНК. Спостерігаються як генетичні зміни, притаманні різним видам пухлинам, так і генетичні порушення, які відрізняються всередині одного типу пухлин. Крім того спостерігаються і специфічні альтерації для конкретного типу раку [147, 148].

Наприклад, у дослідженні пухлино-асоційованих мутацій найбільш відомих 10 онкогенних драйверів (KRAS, EGFR, ALK перебудови, ERBB2, BRAF, PIK3CA, MET ампліфікація, NRAS, MEK1, та AKT1) при раку легені пацієнтів расових груп різних виявлено значні відмінності [149]. Що свідчить й про популяційні фактори, що вносять гетерогенність у розвиток та прогресування пухлин. Для раку легені характерно багато хромосомних та геномних змін, які задіюють як онкогени (*EGFR*, *MYC*, *RAS*, *PIK3CA*, *NKX2-1*,

Таблиця 1.2.

**Значущі та найбільш поширені генетичні порушення у низці злоякісних
пухлин епітелійного походження**

а

Локалізація пухлин/Тип	Хромосоми	Характер порушень	Гени/ функція	Характер порушень	Посилання
Рак легенів	3p, 4q, 5q, 10q, 13q 7q, 8p, 11p, 12p, 14q	Дел., втрата частини короткого/ довгого плеча ампл.	<i>TP53</i> (17p13.1) (ГС) <i>EGFR</i> (7p11.2) (ОГ) <i>MYC</i> (8q24.21) (ОГ) <i>KRAS</i> (12p12.1) (ОГ) <i>ERBB2</i> (<i>HER2</i>) (17q12) (ОГ) <i>PIK3CA</i> (3q26) (ОГ) <i>FHIT</i> (3p14.2) (ГС) <i>RASSF1</i> (3p21.3) (ГС) <i>SEMA3B</i> (3p21.3) (ГС)	с.м. с.м. ампл., ампл., с.м. ампл., с.м. ампл., с.м. дел. дел., епіген. інактивація дел., епіген. інактивація	Heighway J 2003 152 Varella- Garcia M. 2010 150 Laan PA 2017 155 Micke P, 2011 153 Baykara O, 2015 154 Yan M, 2014 156 Varella- Garcia M. 2010 150 Sholl LM 2015 157
Рак молочної залози	1p, 1q, 3p, 6q, 8p, 11q, 13q, 16q, 17p, 17q	Втрата гетерозиго тності	<i>HRAS</i> (11p15.5), (ОГ) <i>KRAS</i> (12p12.1), (ОГ) <i>NRAS</i> (1p13.2) (ОГ) <i>TP53</i> (17p13.1) (ГС) <i>ERBB2</i> (<i>HER2</i>) (17q12) (ОГ) <i>CCND1</i> (11q13.3) (ОГ) <i>FGFR1</i> (8p11.23) (ОГ) <i>BRCA1</i> (17q21.31) (ГС) <i>BRCA2</i> (13q13.1) (ГС) <i>PTEN</i> (10q23.31)(ГС) <i>CDH1</i> (16q22.1) (ГС)	с.м. с.м. с.м. с.м. ампл. ампл. ампл. г.м. г.м. г.м./ с.м., вккг г.м./ с.м., вг	Carcangiu, ML; 2005 157 English DP, 2013, Yan M, 2014 158 Marty B, 2008 159 Kechagiogl ou P, 160 Ngeow J 161, Davis NM 162 Sarrió D, 163, Corso G 164

Продовж. табл. 1.2б.

Локалізація пухлин/Тип	Хромосоми	Характер порушень	Гени/ функція	Характер порушень	Посилання
Рак передміхурової залози	2p, 3q, 7q, 8q, 9q, 17q, 20q, Xq 2q, 5q, 6q, 8p, 10q, 12p, 13q, 16q, 17p, 17q, 18q, 21q, 22q 7, 17 21q22	ампл. частин хромосом, пухлино-асоційовані SNP дел. частин хромосом Гіпердиплоїдія, анеусомія Числені ТЛ -TMPRSS2/ ERG найчастіша	<i>AR</i> (Xq12) (ОГ) <i>BRCА2</i> (13q13.1) (СГ) <i>CDKN1B</i> (12p13.1) (СГ) <i>EZH2</i> (7q36.1) (ОГ) <i>KLK3</i> (<i>PSA</i>) (19q13.33) (ОГ) <i>GSTP1</i> (11q13.2) (СГ) <i>MYC</i> (8q24.21) (ОГ) <i>NKX3.1</i> (8p21.2)(СГ) <i>TP53</i> (17p13.1) (СГ) <i>PTEN</i> (10q23.31)	с.м. г.м. дел., вг ампл. SNP с.м. гмп, ампл. дел, с.м., гмп, вг, г.м./ с.м. вг, с.м.	Chaucherea u A 2011, 167 168 Watson PA 2010 Meiers I 2007 169 Gasi Tandefelt D 2014 170
Рак прямої кишки	1p, 5q 15q, 18q, 17p, 17q 7q та 8p t(5;10)(q22;q 25), inv(5)(q22q3 1.3)	Анеуплоїд. втрата частин та перебудови втрата частин ТЛ	<i>APC</i> (5q22.2), (СГ) <i>BRAF</i> (7q34), (ОГ) <i>CTNНВ1</i> (3p22.1), (ОГ) <i>EGFR</i> (7p11.2) (ОГ) <i>KRAS</i> (12p12.1), (ОГ) <i>MLH1</i> (3p22.2), (СГ) <i>PIK3CA</i> (3q26.32),(ОГ) <i>PTEN</i> (10q23.31) (СГ) <i>TP53</i> (17p13.1) (СГ/ ОГ мутантний) <i>AKT1</i> (14q32.33),(ОГ) <i>SOX9</i> (17q24.3) (СГ/ ОГ)	г.м./ с.м., вг с.м. с.м. с.м. с.м. герм/ с.м. с.м. вг, с.м. с.м. с.м. с.м.	171-176 Koelzer VH 2013, Mármol I, 2017, Kirzin S, 2014 Cuyle PJ, 2017, Day FL, 2013, Hechtman JF, 2015

ALK) та їх шляхи, так і гени супресори росту пухлин (*TP53*, *RBI*, *CDKN2*, кластер генів на 3p) [150]. Серед найбільш важливих факторів росту та проліферації пухлин легенів є рецептори тирозинкінази сімейства ERBB, що кодуються генами рецептора епідермального фактора росту (*EGFR*, 7p12), *ERBB2* (HER2/neu, 17q12), *ERBB3* (12q13) і *ERBB4* (2q33.3). Відмічено, що білок EGFR надмірно експресується у більшості карцином легені [151].

Активізуючі мутації в домені тирозинкінази EGFR переважають у хворих

Продовж. табл. 1.2в.

Локалізація пухлин/Тип	Хромосоми	Характер порушень	Гени/ функція	Характер порушень	Посилання
Рак нирки	3p (3p12-14, 3p21, 3p25) 7, 5 (5q22- qter), 8, 10, 12, 18, 20 Y, 8p, 9p, 13q, 14q	Дел., втрата, несбалансо вані ТЛ Трисомія Втрата частин, вг	<i>VHL</i> (3p25.3) (ГС) <i>FHIT</i> (3p14.2) (ГС) <i>RASSF1</i> (3p21.31) ГС) <i>MET</i> (7q31.2) (ОГ) <i>PTEN</i> (10q23.31) (ГС) <i>HIF-1α</i> (ГС) <i>HIF-2α</i> (ОГ) <i>MTOR</i> (ОГ), <i>PIK3CA</i> (ОГ) <i>PBRM1</i> (ГС)	с.м., вг, гмп с.м., вг, ТЛ. с.м., вг, ТЛ, гмп г.м./ с.м., ТЛ. с.м., дел., ТЛ дел., с.м. с.м., ампл. ТЛ, ампл, с.м. с.м.	177-182 van den Berg E. 2003, Linehan WM 2012, Kim BJ. 2017 Sanchez DJ, 2018 Schödel J, 2016 Brugarolas 2013
Рак шийки матки	3, 11 та 17 4p16, 4q21-35 5p 6p21.3-p25	Втрата гетерозиг. Втрата гетерозиг. ампл. Втрата частин	<i>HPV E2</i> (ОГ) <i>TP53</i> (17p13.1) (ГС) <i>FHIT</i> (3p14.2) (ГС) <i>RASSF1</i> (3p21.31) ГС) <i>PIK3CA</i> (3q26.32),(ОГ) <i>FGF12</i> (3q28-q29), (ОГ) <i>CDH1</i> (16q22.1) (ГС) <i>RBI</i> (13q14.2) (ГС) <i>CDKN2A</i> (9p21.3) (ГС) <i>PTEN</i> (10q23.31) (ГС)	Інтеграція с.м. дел. гмп с.м., ампл. с.м., ампл. с.м., гмп с.м., гмп с.м., дел., гмп с.м.	183-189 Atkin NB 2000, Kersemak ers 1998, Mitra 1999 Femi 2018 Cardoso 2017 Wijetunga 2016 Nassem 2017

на рак легені східної азіатської етнічної групи, чоловіків, що не палять, та жінок [165]. Поряд з цими порушеннями для раку легені характерні реорганізації у вигляді злиття генів або їх частин. Наприклад, злиття генів *EML4-ALK* грає важливу роль у встановленні підтипу раку легені та асоційоване з підтипами ацинарних і солідних пухлин з секрецією муцину [166].

Для раку молочної залози дерегуляція *EGFR* шляху пов'язана з іншими шляхами, а саме *PI3K/PTEN/Akt/mTORC1*, які розглядаються і як мішені для терапевтичної дії [162]. Відомо, що ці шляхи грають провідну роль у онкогенній трансформації, уникненні апоптозу, метастазуванні та

Продовж. табл. 1.2г.

Локалізація пухлин/Тип	Хромосоми	Характер порушень	Гени/ функція	Характер порушень	Посилання
Рак яєчника	3, 8, 12, 14 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12, 20 4, 8, 11, 13, 14, 15, 17, 22 1p, 1q, 3p, 3q, 6q, 7p, 10q, 11p, 11q, 12q	Трисомія ампл. Втрата/ дел. Перебудова за рахунок дел. та несбалансованих ТЛ	<i>EGFR</i> (7p11.2) (ОГ) <i>ERBB2</i> (17q12) (ОГ), <i>KRAS</i> (12p12.1), (ОГ) <i>MYC</i> (8q24.21) (ОГ) <i>CDKN2A</i> 9p21.3) (ГС) <i>RBI</i> (13q14.2) (ГС), <i>BRCA1</i> (17q21.31)(ГС) <i>CTNNB1</i> (3p22.1) (ОГ) <i>CDK12</i> (17q12) (ОГ) <i>FOXL2</i> (3q22.3) (ГС/ОГ) <i>GATA4</i> (8p23.1) (ОГ) <i>TP53</i> (17p13.1) (ГС) <i>CCNE1</i> (19q12) (ОГ)	ампл., с.м. ампл., с.м. с.м. с.м., ампл. с.м., дел., гмп с.м., делеції г.м/ с.м. с.м. с.м. с.м. с.м., гмп с.м. ампл., гіпомет.	190-197 Lee-Jones 2004 Aunoble 2000 Shibuya 18 Kalamanathan 2011 Vanderstich ele 2017 Leung 2016 Anttonen 2014, Bubancova 2017 Bai.2016

Примітки: 1. ОГ – онкоген; 2. ГС- ген супресор росту пухлин (TSG); 3. ампл. – ампліфікація; 4. дел. – делеція; 5. ТЛ – транс локація; 6. с.м. – соматична мутація; 7. г.м. – гермінальна мутація; 8. вккг - втрата кількості копій гена; 9. вг - втрата гетерозиготності; 10. гмп – гіперметилування промотору; 11. SNP – одно-нуклеотидний поліморфізм

резистентності до ліків. Експресія генів цих шляхів порушується при раку молочної залози шляхом соматичних мутацій, ампліфікацій. Серед них *HER2*, *ESR1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *EGFR1*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, *RB*, які є як онкогенами, так і генами супресорами росту пухлин [159-161]. Вплив на ці шляхи та їх гени представники дискутується у рамках клінічних випробувань нових малих молекулярних інгібіторів [162]. Для раку молочної залози на теперішній час добре розроблена система класифікації згідно геномних молекулярних особливостей пухлин [198]. Вона дозволяє виявити базальний та люмінальний підтипи раку. Крім того окреме місце серед раків молочної залози займає тричі

негативні пухлини [199], які характеризуються втратою екстрогенового, прогестеронового та HER2 рецепторів та стійкістю до багатьох препаратів та самі включають наступні підтипи: базально-подібний, мезенхімний, люмінальний з експресією андрогенового рецептору та імунозбагачений [200].

Для раку товстого кишечника є характерними наступні генетичні порушення: спадкові та соматичні мутації, включаючи зміни, що спричинені дефіцитом репарації ДНК, а також геномні зміни: хромосомна нестабільність, мікросателітна нестабільність, анеуплоїдія, втрати хромосом, хромосомні перебудови втрати частин хромосом, делеції 5q, 15q, 18q, 17p, 17q, що призводить до дерегуляції WNT, RTK/Ras/MAPK, PI3K, TGF-Beta ата P53 сигнальних шляхів [171, 176].

Характерними змінами раку передміхурової залози є генетична інактивация генів *NKX3.1* та *PTEN*, що контролюють епітелійну диференціацію клітин й запобігають онкогенній ініціації [170]. В той же час, серед онкогенних чинників, найбільш притаманних цьому виду раку, є поява експресії довгої некодувальної РНК *PCa3*, яка призводить до пригнічувального ефекту гена-супресора *PRUNE2*, що знаходиться на компліментарному ланцюгу ДНК [201].

Встановлено, що різні типи пухлин, як і індивідуальні пухлини мають власні патерни соматичних мутацій [7, 202], та генетичних порушень, що реалізується у явищі гетерогенності всередині пухлин, між пухлинами та типами пухлин [203, 204]. Серед соматичних мутацій розрізняють тип так званих драйверних, або причинних мутацій [205] та мутацій-пасажирів, які є наслідком канцерогенного процесу з однієї сторони, а з іншої, вони є факторами, що посилюють та поглиблюють агресивні властивості пухлин [206] та відбуваються протягом всього процесу канцерогенезу [207]. Точно визначити та розрізнити ці два типи поки не можливо, але є підходи, завдяки яким вже детектовано низку драйверних мутацій та генів у канцерогенезі, причому більшість з них базується на обчислювальних та інтергративних підходах аналізу баз даних генетичних порушень згідно широкомасштабних досліджень раку [208-212].

Для експериментальної перевірки функцій драйверних генів у канцерогенезі запропоновано реплікаційно-некомпетентні ретровірусні та лентівірусні експресійні системи [213, 214].

Генетичні порушення серед яких делеції, ампліфікації, перебудови, соматичні мутації, можуть бути спричинені як екзогенними (ультрафіолет, нікотин, канцерогени) [215, 216], так і ендогенними факторами організму, наприклад дезамінування (спонтанне і ферментативне за рахунок дії низки ензимів, зокрема APOBEC білків), окислення, алкілування, реплікативні помилки) [217, 218]. Для відновлення цілісності ДНК існують механізми, які можуть бути загальмовані та неспрацьовувати у канцерогенезі, а саме: реплікативна репарація, рекомбінантна репарація, екзиційна репарація, виправлення помилок спарених основ (Mismatch repair) [217].

Сімейство білків APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like) має різноманітні і важливі функції в нормі та при патологіях людини. Ці білки мають здатність зв'язуватися як з РНК, так і з одноланцюговою ДНК та мають ферментативну функцію дезамінування цитидину. Ця функція, як і специфічна тканинна експресія, широко варіюють для кожного з білків APOBEC. Втрата клітинного контролю активності білків сімейства APOBEC призводить до гіпермутабельності ДНК і порушення редагування РНК, що тісно пов'язано з дефектами репарації ДНК та розвитком раку [219]. Цей ефект пов'язан з формуванням промутагенного урацилу в геномній ДНК [220]. Ензими APOBEC мають динуклеотидні специфічності, які впливають на мутаційні характеристики. Хоча отримано численні кристалічні структури взаємодії ферментів з одноланцюговою ДНК, механізми глобального їх розпізнавання і локального відбору цільових послідовностей залишаються до кінця неясними [221]. Але це не заважає розробці малих інгібіторів ензимів для лікування різних видів раку [215, 221].

На відміну від генетичних порушень, епігенетичні зміни є зворотними і включають ключові процеси метилювання геномної ДНК, модифікації гістонів, модифікації хроматину, зміни позиціонування нуклеосом і експресії профілів

некодувальних РНК. Зриви в епігенетичних процесах можуть призвести до змінених функцій генів та викликати процес клітинної неопластичної трансформації. Епігенетичні модифікації передують генетичним змінам і зазвичай відбуваються на ранній стадії пухлинного розвитку [222, 223]. Серед епігенетичних порушень у процесі канцерогенезу на сьогодні найбільш вивченими є означені вище процеси, а саме, метилювання промоторів генів, ацетилювання та метилювання гістонів, зміни стану хроматину, експресія некодувальних РНК. Ці аберації вивчаються як для встановлення механізмів виникнення, розвитку та метастазування пухлин, виявлення біомаркерів, що пов'язані як з ранньою діагностикою, прогнозуванням перебігу хвороби, так і для розробки засобів та заходів терапії онкологічних захворювань [224].

Порушений епігенетичний стан у ракових клітинах характеризується глобальним геномним гіпометилюванням в протилежність гіперметилюванню CpG-острівців промоторів генів-супресорів росту пухлин [225, 226]. Глобальне геномне гіпометилювання провокує підвищення експресії онкогенів [224]. У еукаріотів стан метилювання ДНК є загальною епігенетичною зміною, і ці епігенетичні особливості характерні для гетерохроматину. Метилювання ДНК відіграє важливу роль у підтримці стабільності геному, геномного імпринтингу, інактивації X-хромосоми у жінок, регуляції транскрипції, а також у процесі розвитку організму [227]. Перетворення цитозину в 5-метилцитозин (5mC) здійснюється ДНК-метил-трансферазами (DNMTs). Ці ферменти використовують S-аденозил метіонін (SAM) в якості ключового донора метильної групи. Існують дві основні категорії DNMT в клітинах ссавців, підтримуюча метилтрансфераза (*DNMT1*) і *de novo* метилтрансферази (*DNMT3A, DNMT3B*) [228].

Хоча прийнято, що ДНК-метилтрансферази є специфічними у своїх функціях і не перекриваються, все-таки недавні дані свідчать про перекривання ролі *de novo* метилтрансфераз з підтримуючою метилтрансферазою [229]. Крім того стан метилювання залежить не тільки від активності DNMTs, а й від активності ДНК-деметиلاзи і швидкості реплікації ДНК [230]. Завдяки

метилуванню CpG-острівців промоторів відбувається перешкоджання зв'язуванню різних факторів транскрипції з їх сайтами та безпосередньо шляхом активування білків метил-CpG (сімейство MBD), що зв'язуються з 5-метилцитозином. Білки MBD використовують ферменти, що модифікують гістони, і комплекси ремоделювання хроматину в метильованих ділянках і полегшують репресію транскрипції [231]. Комплекс ремоделювання хроматину, подібний до NuRD, зв'язується з білком MBD2 і метилує ДНК. Мутації в межах доменів MBD відбуваються при багатьох захворюваннях, включаючи неврологічні розлади і рак, що призводить до втрати специфічності зв'язування MBD з метильованими ділянками і дерегулювання генів [232]. Ці механізми відіграють центральну роль у встановленні критичної ролі метилування ДНК в епігенетичній регуляції експресії генів.

Серед генів з частими генетичними порушеннями у канцерогенезі (табл. 1.2) деякі з них мають ще зміни статусу метилування промоторів, тобто гіпо- або гіперметилування. Зокрема, гіперметильовані промоторні ділянки мають *RASSF1*, *SEMA3B* – при раку легенів [150], *PTEN*, *CDH1* – при раку молочної залози [163, 164], *GSTP1*, *NKX3.1* – при раку передміхурової залози [169, 170], *VHL* – при раку нирки [177], *RASSF1*, *CDH1*, *RBI* – при раку шийки матки [185, 187], *CDKN2A*, *GATA4* – при раку яєчника [196, 197].

Генетичні та епігенетичні порушення у тих же самих генах не є випадковими. Так, нещодавно виявлено асоціації між 737 клінічно-значущими мутаціями у генах, причетних до розвитку раку (driver genes) та сайт-специфічними змінами метилування цих генів [233]. Крім того, інші дослідники, вивчали кореляції між метилуванням геномної ДНК та експресією генів у 33 типах раку та приблизно 11000 пацієнтів за даними TCGA проекту [23, 235]. Згідно аналізу трьох регіонів промоторів генів виявлено різні патерни метилування їх CpG-острівців, що має різноспрямований вплив на експресію досліджуваних генів. Деякі з цих даних суперечать класичним уявленням про кореляції між метилуванням та експресією, що потребує більш детальних досліджень [235].

Явище метилювання багатьох генів супресорів у канцерогенезі отримало назву метилювальний фенотип CpG-острівців (CIMP), яке вперше ідентифіковано і найбільш широко вивчено при колоректальному раку [236, 237]. Крім того, термін «CIMP» неодноразово використовувався протягом останніх десятиріч для опису одночасного метилювання промоторів генів в інших типах пухлин, включаючи рак сечового міхура, шийки матки, шлунка, печінки, мозку (гліоми), легені, нирки, яєчника, та інших видів раку [238- 242]. Досі є суперечки на рахунок чи CIMP є універсальним явищем для всіх раків, чи він являє собою специфічний фенотип для певного виду раку [237, 243, 244].

Наступний рівень епігенетичних порушень у канцерогенезі є зміна модифікацій гістонів: ацетилювання, метилювання, фосфорилування, убіквітинування [245, 246], які складають так званий «гістоновий код» [247]. Октамер з чотирьох глобулярних білків гістонів (H2A-H2B димер та H3-H4 тетрамер) складає серцевину нуклеосоми, яка з'єднується п'ятим лінкерним гістоном H1. Вільні N-кінцеві хвости цих білків є дуже гнучкими і багатими залишками лізину і аргініну, які можуть бути широко модифіковані, що може призводити до зміни заряду білків в цілому та як втраті їх зв'язку з ДНК [248], так і зміні взаємодії з іншими білками [249]. Найбільш вивченими модифікаціями є ацетилювання та метилювання залишків лізину на N-кінцевих хвостах гістонів та метилювання аргініну [250]. Ацетилювання залишку лізину гістонових хвостів є дуже поширеним і їх рівні асоціюються з транскрипційно активним хроматином. Ацетилювання інактивує позитивний заряд на гістонових білках шляхом ацетилювання ϵ -аміногрупи залишків лізину за допомогою ацетилтрансфераз (HATs), які використовують ацетил-КоА в якості донора ацетильної групи [245, 251]. Ензимами, що приймають участь у модифікаціях гістонів, а саме гістонові-ацетилази (HATs), гістонові-деацетилази (HDACs), гістонові-метилази (HMTs), гістонові-деметилази (HDMTs) та інші епігенетично-асоційовані білки [252, 253], можуть бути дерегульованими при канцерогенезі різних типів раку й мати генетичні порушення (мутації, транслокації, делеції, ампліфікації) та як наслідок зміни

експресії в пухлинах [254]. Виявлення цих порушень є основою для розробки мішенних препаратів інгібіторів для лікування раку (epi-drugs) [253, 255-258]. Слід відмітити, що вже виявлено низку перспективних молекулярних мішеней серед малих молекул або біологічних інгібіторів, які протидіють епігеномно-метаболичній взаємодії при раку [259].

Наступний рівень епігенетичної регуляції канцерогенезу представлений великою групою некодувальних РНК (нкРНК), яка складається з низки класів, які мають свою власну будову та функції як в нормі, так і при розвитку пухлин, а також приймають участь майже у всіх клітинних процесах в організмі та міжклітинних взаємодіях [260]. За їх основними функціями нкРНК можна розділити на інфраструктурні та регуляторні. Конститутивно експресовані інфраструктурні нкРНК представлені рибосомними, трансферними, малими ядерними та малими ядерцевими РНК (snoeRNAs). Регуляторні нкРНК в свою чергу діляться на класи: мікроРНК (miRNAs), Piwi-взаємодіючі РНК (piRNAs), циркулярні (circRNAs), малі інтерферуючі РНК (siРНК) і довгі некодувальні РНК (lncRNA). Крім того, нещодавно був описаний новий клас промотор-асоційованих РНК (PARs) та енхансерних РНК (eРНК) [261, 262]. Розміри нкРНК варіюють від 20 нт у miRNA до 9000 нт у енхансерних РНК. Спочатку вважалося, що регуляторні нкРНК просто контролюють експресію генів на пост-транскрипційному рівні, але останні дослідження показали, що ці РНК, особливо lncRNA, широко пов'язані з різноманітними комплексами ремоделювання хроматину і націлюють їх на специфічні геномні локуси, щоб змінити метилування ДНК або модифікації гістонів [263]. Показано, що нкРНК модулюють внутрішньоклітинну сигналізацію для контролю різноманітних клітинних процесів, включаючи рівні і активність рецепторів, проліферацію, інвазію, міграцію, апоптоз і стовбуровість при розвитку епітелійних пухлин [264, 265].

Найбільш вивченими у процесі канцерогенезу є довгі некодувальні та мікро РНК. Відомо, що довгі некодувальні РНК (lncRNAs) діють як конкуруючі ендogenous РНК (ceRNAs), при цьому мікроРНК (miRNAs) і lncRNAs регулюють

один одного через свої сайти зв'язування [266]. Але це не єдині взаємозв'язки різних типів нкРНК. Так, деякі lncRNA кодують miRNAs і малі ядерцеві РНК (snoRNA) і можуть регулювати експресію цих малих РНК як попередників. Малі ядерцеві РНК також як попередники для piRNAs можуть регулювати їх експресію. Ці miRNAs і piRNAs орієнтовані на мРНК і регулюють експресію генів [267, 268]. Вся ця складна система взаємодій, що охоплює всі рівні регуляції функцій в клітині може проявляти себе у якості як онкогенних чинників, так пухлино-супресорних впливів [269] та являться маркерами для діагностики та прогнозу перебігу захворювання. Але функції lncRNA, як і інших видів нкРНК у клітинах в нормі та при розвитку патологій на цьому не завершуються. Так, lncRNAs приймають участь в різних епігенетичних регуляторних процесах у канцерогенезі, включаючи координацію динаміки хроматину, регулювання метилювання ДНК, модуляцію інших нкРНК, впливають на стабільність мРНК та сплайсинг, miRNA-опосередковану регуляцію експресії генів, діючи як губка мікроРНК, здійснюють контроль доступності епігенетичних субстратів за допомогою порушеного метаболізму у пухлинах [270-272].

Відомо, що змінений клітинний метаболізм у пухлинах впливає на всі ланки епігенетичної регуляції, зокрема на модифікації гістонів через доступність донорних субстратів (ацетил-КоА і S-аденозилметіоніну (SAM) для реакцій ацетилювання і метилювання [273]. Мутації в метаболічних ферментах, таких як ізоцитратдегідрогеназа 1 і 2, викликають накопичення метаболітів, які порушують баланс гістонів і метилювання ДНК, що призводить до широкомасштабної дерегуляції епігенетично контрольованої експресії генів. Крім того, модифікації каталітичної активності та субклітинної локалізації метаболічних ферментів при раку можуть впливати на епігенетичні модифікації та програми експресії генів, що сприяє прогресії пухлин [274]. Але, з іншого боку, зворотність епігенетичних процесів та можливість впливу на них за допомогою дієти [275], фізичних вправ [276] та інших факторів, що належать до стилю життя людини, дає надію на розробку допоміжних антиракових

методів й впливів для ефективного лікування хворих та виявлення й впровадження лікувально-профілактичних засобів при наявності факторів ризику розвитку онкологічних захворювань.

Отже, ракові клітини містять множинні генетичні та епігенетичні аномалії. Незважаючи на всю складність, виживанню клітин та прогресії пухлин часто можна запобігти за рахунок інактивації одного онкогена. Це явище, називається "онкогенна залежність". Воно дає обґрунтування молекулярно-цільової/таргетній терапії [277, 278]. Однак, комбінована терапія також може бути необхідна для запобігання виходу раку з стану онкогенної залежності [279]. Слід зауважити важливу роль онкогенної інактивації у регресії пухлин імунною системою та зміні пухлино-стромальних взаємодій, що буде розглянуто нижче [280].

Реактивація генів-супресорів є іншим перспективним підходом для зупинення росту пухлин. Насьогодні показані шляхи епігенетичного відновлення експресії генів-супресорів, якщо вони не мають генетичних порушень у пухлині, таких як *MGMT*, *MLH1* та *RASSF1A* при плоскоклітинних карциномах голови та шиї [281], гена *MLH1* у клітинних пухлинних лініях [282]. Активація генів супресорів спостерігалась при введенні енергетичних рестрикційних агентів завдяки впливу на метилювання генів *GADD45a*, *GADD45b*, *IGFBP3*, *LAMB3*, *BASP1*, *GPX3*, *GSTP1* при раку передміхурової залози, підвищуючи їх експресію [283]. Інший підхід можливий на білковому рівні – це інактивація негативних регуляторів функції білків генів супресорів, як, наприклад, інгібування MDM2 для реактивації p53 у пухлинах [284 Gupta]. В даний час є цілий спектр антиракових епігенетичних препаратів знаходиться на різних стадіях клінічних випробувань, включаючи інгібітори деацетилази гістонів, деметилази гістонів, інгібітори метилтрансферази ДНК і інгібітори бромодоменів [285].

1.1.4. 3-я хромосома людини в канцерогенезі епітелійних пухлин. 3-я хромосома людини є однією з самих широко досліджуваних при різних видах раку. Завдяки методам каріотипування, аналізу втрати алелів, методам

порівняльної гібридизації ДНК встановлено часту втрату частин 3-ої хромосоми у низці спорадичних пухлин [19-21]. Делеції, що відбуваються в пухлинних клітинах, вважаються першою ознакою можливого розташування генів-супресорів пухлин [22]. Ідентифікувати потенційні гени-супресори росту пухлин вдалося після успішного фізичного картування 3-ої хромосоми людини за допомогою технології NotI-пов'язаних та стрибаючих клонів [23-28].

Для 3-ої хромосоми людини виявлено локуси, які мали найчастіші зміни у різних видах раку (3p25, 3p21.3 та 3p14) серед яких найбільш часто делетована ділянка 3p21.3 (AP20), в якій знаходять близько 50 генів [286]. Ці зміни вказують на наявність більш ніж одного гена-супресора росту пухлин на цьому плечі [287]. Дійсно, для низки генів з цих локусів вже доведена їх супресорна функція. Так, ген *FHIT* (fragile histidine triad) з ділянки 3p14.2 є геном супресором пухлин легені [288]. Він має важливу роль як охоронець геному. Втрата *FHIT* призводить до дисбалансу нуклеотидів, спонтанного реплікаційного стресу і розривів ДНК, що призводить до глобальної нестабільності генома, що може сприяти придбанню онкогенної мутації і прискорити клональну експансію [289]. Внаслідок цього втрата активності *Fhit* індукує мутаторний фенотип [290]. Ген *VHL* (Von Hippel-Lindau) розташований на ділянці 3p25, пов'язують з регуляцією транскрипційної відповіді на гіпоксію та чутливістю пухлин до кисню [291]. Рання інактивація *VHL* зазвичай спостерігається в клітинах світлоклітинної карциноми нирки, і дані, отримані в результаті функціонального аналізу *pVHL*, стали основою для рутинного лікування раку нирки з новою цільовою терапією [292]. Цей ген, який пов'язаний з домінантною спадковістю, що визначає хворобу фон Гиппель-Ліндау, при якій спостерігається розвиток багатьох типів раку [293].

На ділянці 3p24 розташований ген *RARB* (retinoid acid receptor beta), який грає важливу роль у регуляції функцій епітелійних клітин [294]. Показано, що експресія *RARB* знижена в багатьох пухлинах, включаючи рак легенів та ракові клітинні лінії [295]. Однак, експресія *RARB* не корелює з втратою

гетерозиготності на ділянці 3p24, але відомо, що метилювання промоторної ділянки *RARB* може інактивувати експресію гена [296].

Вивчення делецій в регіоні 3p21.3 LUCA і AP20 в карциномах нирки, легені і молочної залози виявило чотири гени потенційні супресори росту пухлин в цьому інтервалі, а саме *APRG1*, *ITGA9*, *HYA22* і *VILL* [297].

Для низки потенційних генів супресорів з регіонів 3p21.3 LUCA і AP20 показана здатність інгібувати ріст пухлинних клітин як *in vitro* так і *in vivo*, а саме *FUS1*, *RASSF1A*, *RASSF1C*, *SEMA3B*, *SEMA3F*, *RBSP3* [298-301]. Тоді як для генів *HYAL1* та *HYAL2* з вказаних вище регіонів ця властивість була притаманна лише в умовах *in vivo* [302]. Така відмінність може свідчити про вплив мікрооточення пухлин і, ймовірно, можливість цих генів контролювати міжклітинні взаємодії і мікрооточення, що може слугувати потенційними мішенями для лікування раку та біомаркерами для його діагностики [303].

Якщо результати вивчення короткого плеча 3-ої хромосоми свідчать про наявність генів-супресорів, то на 3q плечі навпаки виявлено потенційні онкогени. Так при плоскоклітинному раку легені виявлено розповсюджену 3q хромосомну ампліфікацію де розташовані гени *PIK3CA*, *SOX2*, *ACK1*, *PRKCI*, *TP63*, *PLD1*, *ECT2* та інші гени, що мають онкогенні властивості при прогресії раку легені [304]. Крім раку легені, встановленою характеристикою плоскоклітинного раку голови та шиї є ампліфікація ділянки хромосоми 3 (3q26-29), яку пов'язують з поганим прогнозом для пацієнтів [305].

За допомогою біоінформативного аналізу зміни копій близько 200 генів 3q26-29 при плоскоклітинному раку легені виявлено набір з 35 генів 3q26, які координовано ампліфікуються і надмірно експресуються в пухлинах легені людини. Аналіз шляхів виявив, що 21 з цих генів існує в межах одного передбаченого модуля мережі. Центральне місце цієї мережі займають чотири гени 3q26: *SOX2*, *ECT2*, *PRKCI*, *PIK3CA*, навколо яких вона організована. Вказані гени співпрацюють з онкогенами, які функціонують в рамках інтегрованої мережі сигналізації, що призводить до високо-агресивного, стовбурово-подібного фенотипу раку легені з 3q26 ампліфікацією [306].

Поряд з делеціями для генів супресорів та потенційних кандидатів виявлено їх численні мутації та епігенетичні порушення у низці епітелійних пухлин. Ці зміни вважають альтернативними шляхами інактивації генів супресорів у пухлинах [301]. Метилування промоторів генів *RASSF1A*, *BLU*, *FHIT*, *CRBP1* з 3p22.3-24.3 та генів *RASSF1A*, *BLU*, *FHIT*, *CRBP1* з 3p12.3-14.2 виявлено поряд з втратою гетерозиготності у карциномах печінки [307]. Втрати алелів та гіперметилування промоторів генів *VHL*, *RARB*, *RASSF1A* і *FHIT* з короткого плеча хромосоми 3 (3p) описано для плоскоклітинного раку стравоходу. Причому ці два типи змін не мають між собою чітких кореляцій, тобто представляють різні механізми інактивації генів при канцерогенезі [308]. Генетична та епігенетична інактивація гена супресора росту пухлин *VHL* детектована у світлоклітинних карциномах нирки поряд з мутаціями низки генів 3p14-p21 регіону [19]. Гіперметилування та втрати гетерозиготності виявлені для генів *RARB* та *FHIT* при раку шийки матки [309]. Поряд з делецією потенційного гена супресора *RASSF1A* виявлено метилування його промотору як для світлоклітинних та папілярних карцином нирки [310], так і для карцином голови та шиї [311].

Пошук широкомасштабних порушень 3-ої хромосоми людини почався зі створення технології NotI-мікропанелей, яка є методом порівняльної геномної гібридизації і дозволяє завдяки чутливості NotI-рестриктази до метилування виявляти як генетичні, так і епігенетичні порушення в геномі одночасно [312, 313]. Низкою дослідників вивчено генетичні та епігенетичні порушення 180 клонів 3-ої хромосоми людини у деяких епітеліальних пухлинах, зокрема у немілоклітинному раку легені [29], у раку шийки матки [314], у світлоклітинній карциномі нирки [30]. Сорок чотири гени показали метилування та / або делеції у більш ніж 15% недрібноклітинного раку легені. Серед них як відомі гени-супресори *RBSP3* (*CTDSPL*), *VHL* та *THRB*, так і гени, для яких не описано участь у канцерогенезі легені, серед яких *RPL32*, *LOC285205*, *FGD5*. [29]. Тридцять генів, включаючи гени-супресори росту пухлини або кандидати на цю роль, серед яких *VHL*, *RBSP3* / *CTDSPL*, *ITGA9*,

LRRC3B, *ALDH1L1*, *EPHB1*, та гени, раніше невідомі як пухлино-асоційовані, такі як *ABHD5*, *C3orf77*, *PRL32*, *LOC285375*, *FGD5* та інші, показали метилювання / делеції у 21-44% раку шийки матки [314]. Для світлоклітинної карциноми нирки за допомогою NotI-мікропанелей виявлено двадцять два гени 3-ої хромосоми людини, які мали метилювання та / або делецію в 17-57% пухлин. До переліку цих генів входять гени-супресори росту пухлини або кандидати (*VHL*, *CTDSPL*, *LRRC3B*, *ALDH1L1* і *EPHB1*) та гени, які раніше не вважалися асоційованими з канцерогенезом (*LRRN1*, *GORASP1*, *FGD5* та *PLCL2*) [30]. Крім того дослідники підтверджували отримані результати за допомогою інших методів: втрата гетерозиготності, метил-специфічна ПЛР та секвенування, вивчення експресії методами ПЛР та ПЛР у реальному часі. Багато з цих даних підтвердило результати NotI-мікропанелей [33, 315, 316].

Отже, гени 3-ої хромосоми людини грають важливу роль у канцерогенезі епітелійних пухлин різних локалізацій. Новітня технологія NotI-мікропанелей є перспективною для скринінгу пухлино-асоційованих порушень, пошуку пухлино-специфічних змін та розкриття механізмів прогресії пухлин, діагностичних та прогностичних маркерів. Це важливо провести й для інших типів раків, щоб встановити як загально-пухлинні зміни, так і пухлино-специфічні порушення 3-ої хромосоми людини і геному взагалі, враховуючи «гарячі точки», які є актуальними для канцерогенезу.

1.2. Метаболічні особливості та міжклітинні взаємодії у канцерогенезі

1.2.1. Метаболічне перепрограмування ракових клітин. Набуття трансформованими клітинами онкогенних ознак й посилення агресивності ракових клітин та епітелійно-мезенхімний перехід при прогресії та метастазуванні пухлин неможливі без перепрограмування клітинного метаболізму, яке спричинене описаними вище генетичними й епігенетичними порушеннями та активацією протоонкогенів й пов'язаних з ними онкогенних шляхів з одночасною втратою регуляторних функцій генів супресорів росту

пухлин [34-38]. Онкогени, такі як *MYC*, *BRAF*, *KRAS* та *PI3K*, задіяні у перепрограмуванні метаболізму трансформованих клітин на користь проліферації та неконтрольованого росту [39-41].

Метаболізм ракових клітин має характерні ознаки, які можна згрупувати у наступні блоки: порушення поглинання глюкози, амінокислот, ліпідів; використання опортуністичних режимів здобуття поживних речовин (перерозподіл ресурсів організму під власні потреби); використання проміжних продуктів гліколізу/циклу трикарбонових кислот (ТСА) для біосинтезу і NADPH; підвищена потреба в азоті; порушення метаболіт-опосередкованої регуляції експресії генів; метаболічні взаємодії з мікрооточенням [317, 318].

Останніми роками вважається, що метаболічне репрограмування флуктуацій біоенергетичних сполук і модуляція окисного стресу є новими ключовими ознаками розвитку пухлин. При раку підвищене поглинання глюкози і висока гліколітична активність, як джерело аденозинтрифосфату, є перевагою росту для пухлин в умовах гіпоксичного стресу [319]. Це являє собою загальновідомий ефект Варбурга [320], який служить перспективною мішенню для діагностики та терапії раку [321]. Ефект Варбурга вважається невід'ємною частиною метаболічного репрограмування ракових клітин і центральним фактором прогресування раку [322]. На основі цього ефекту розвинуто один з основних клінічних діагностикумів для виявлення ракових клітин з використанням аналогів глюкози: позитронна емісійна скануюча томографія (the positron emission tomography scan imaging) [323, 324]. Однак, утилізація глюкози та джерел вуглецю в пухлинах є набагато більш гетерогенними, ніж вважали спочатку. Дійсно, з'явилися нові дані стосовно подвійної здатності пухлинних клітин до метаболізму гліколітичного та окисного фосфорилування (OXPHOS). Метаболізм OXPHOS, який переважно спирається на мітохондріальне дихання, демонструє регуляцію комплексів дихальних ланцюгів і підвищену антиоксидантну реакцію або детоксикаційну здатність [325]. OXPHOS-залежні ракові клітини використовують альтернативні субстрати, такі як глютамін і жирні кислоти [326].

Різноманітність вуглецевих субстратів, що підживлюють неопластичні клітини, свідчить про метаболічну гетерогенність, навіть у пухлинах, що мають однакову клінічну діагностику. Метаболічний перемикач підтримує стовбуровість ракових клітин та їхні енергоємні функції, такі як розповсюдження, виживання, міграція та метастазування. [325]. ОХРНOS/ цикл трикарбонових кислот (ТСА), пентозофосфатний шлях (PPP), глюконеогенез, метаболізм глютаміну відіграють ключову роль у розвитку пухлин і метастазуванні раку [327, 328].

Всі наведені метаболічні зміни неможливі без генетичних порушень мітохондріальної ДНК [329]. Значні делеції мтДНК були виявлені *in vivo* в різних типах раку, включаючи рак печінки, легені, шлунку і товстого кишечника, карциному передміхурової залози і рак молочної залози [320, 331]. Особливе місце у дерегуляції глюкозного метаболізму грають онкогени й гени-супресори росту пухлин та їх продукти, які надають метаболічні переваги раковим клітинам, посилюючи ефект Варбурга та прогресію пухлин [332].

Більш того, мітохондріальний метаболізм ракових клітин, індукований різними видами кисню має важливе значення для активації взаємодії з компонентами мікрооточення пухлини. Фібробласти й імунні клітини, асоційовані з карциномами, беруть участь у метаболічній взаємодії з неопластичними клітинами. Вони колективно адаптуються в динамічній манері до метаболічних потреб ракових клітин, таким чином беручи участь у резистентності пухлин до лікування [325]. Перетинання різних метаболічних ознак пухлин у єдину сіть свідчить про їх об'єднання заради головної функції раку – кілерної по відношенню до організму [94, 95].

Дерегульований анаболізм/катаболізм жирних кислот і амінокислот, особливо глютаміну, серину і гліцину, були ідентифіковані як метаболічні регулятори в підтримці росту ракових клітин [333-335]. Виявлено низку перехресних зв'язків між дерегульованою метаболічною мережею і сигналізацією ракових клітин. Ці досягнення надихнули на розвиток нових

стратегій лікування різних злоякісних новоутворень, орієнтуючись на особливості метаболізму ракових клітин [336, 337].

Глутамін - це другий основний субстрат після глюкози, що підтримує ріст ракових клітин та є джерелом не тільки вуглецю, але і відновленого азоту для біосинтезу *de novo* низки різноманітних азотовмісних сполук, переважно пуринових і піримідинових нуклеотидів, глюкозамін-6-фосфатів, а також низки амінокислот [338, 339]. Ці процеси особливо активуються під впливом онкогенних факторів та чинників [340, 341]. Як повідомляється, глутамін також відіграє певну роль у поглинанні клітиною незамінних амінокислот. Хоча замінні амінокислоти можуть продукуватися клітинами ссавців *de novo*, незамінні амінокислоти повинні бути отримані з зовнішніх джерел. Імпорт незамінної амінокислоти лейцину через нейтральний амінокислотний антипортер LAT1 на плазматичній мембрані виявився пов'язаним з одночасним виведенням глутаміну з клітини [342]. Таким чином, внутрішньоклітинний глутамін може полегшити імпорт широкого кола субстратів LAT1, включаючи лейцин, ізолейцин, валін, метіонін, тирозин, триптофан і фенілаланін [343]. Крім цього транспортера виявлено, що глутаміновий транспортер ASCT2 здатен активувати розвиток пухлин незалежним від LAT1 шляхом [344]. Метаболізм глутаміну регулюється як онкогенами, так і генами-супресорами пухлин [345-348], що робить його привабливою мішенню для розробки терапевтичних засобів для лікування [349].

Багато ракових захворювань проявляють підвищену потребу в конкретних амінокислотах і стають залежними від екзогенного постачання або підвищеного синтезу *de novo* [350]. Серед них серин та гліцин. Вони є біосинтетично пов'язаними і разом забезпечують необхідні попередники для синтезу білків, нуклеїнових кислот і ліпідів, які мають вирішальне значення для росту клітин раку [351]. Крім того, біосинтез серину / гліцину також впливає на антиоксидантну здатність клітин, таким чином підтримуючи гомеостаз пухлин [352]. Важливість метаболізму серин / гліцин додатково підкреслюється генетичними та функціональними ознаками, що свідчать про те, що

гіперактивація біосинтетичного шляху серин / гліцин прискорює онкогенні процеси [353, 354].

Важливу роль у нуклеотидному синтезі, метилюванні та окисно-відновному метаболізмі ракових клітин грає одноуглецевий обмін [355]. Одноуглецевий метаболізм охоплює як цикли фолатів, так і метіоніну і дозволяє клітинам генерувати одноуглецеві одиниці (також називаються метильними групами) і використовувати їх для біосинтезу важливих анаболічних попередників і для реакцій метилювання. Завдяки цьому підтримується висока проліферативна швидкість ракових клітин [356]. Амінокислота серин є основним джерелом одноуглецевого обміну [357]. Встановлено, що ракові клітини особливо чутливі до позбавлення одноуглецевих одиниць за рахунок обмеження серину або інгібування його синтезу *de novo* [355, 358]. Встановлено, що антифолати, лікарські засоби, які націлені на одноуглецевий метаболізм, вже давно використовуються при лікуванні раку [359].

Ліпідний метаболізм відіграє фундаментальну роль у підтримці нормальної функції здорових клітин. Він регулює сигналізацію, зберігання енергії, склад та властивості клітинної мембрани, синтез стероїдних гормонів, метаболітів жирних кислот [360]. Зміна метаболізму ліпідів є важливою особливістю раку, оскільки ракові клітини змінюють свій метаболізм для виконання вимог їх прискореної проліферації. Цей аберантний обмін ліпідів впливає на клітинні процеси, такі як ріст клітин, виживання та міграція [361].

Порушення ліпідного метаболізму слугують метаболічному репрограмуванню ракових клітин [362]. Ліпідний обмін в ракових клітинах включає наступні основні етапи: імпорт ліпідів (ліпопротеїдів низької щільності і ліпопротеїнів високої щільності); катаболізм (окислення ліпідів (FAO) і цикл трикарбонових кислот (TCA)); ліпогенез; синтез холестерину; експорт ліпопротеїнів і холестерину; а також зберігання ліпідів [363]. Всі ці процеси зазвичай змінюються при розвитку пухлини і також залежать від сигналів мікрооточення пухлини [364-366].

Завдяки виявленим порушенням ліпідного обміну виявлено низку генів-мішеней для втручання у цей тип метаболізму при створенні ефективної протипухлинної терапії. Серед цих мішеней гени *FASN*, *ACLY*, *ACC*, *CPT1*, *COX2*, *HMGCR*, *PPARG*, *SREBP1*, *SOAT1*, *CYP17*, *PGE2R*, *SIP*, *SIPR1* та інші, які належать до всіх ланок ліпідного обміну [361, 367, 368]. Низку інгібіторів вже створено для лікування інших хвороб людини, які показали себе ефективними й для лікування онкологічних захворювань. Серед них статини (HMGCR-інгібітори), протизапальні COX2-інгібітори, фібрати – гіполіпідемічні препарати, ліганди PPAR α [369, 370].

У результаті зміненого ліпідного обміну у канцерогенезі змінюються властивості клітинної мембрани та її складових. Ліпідні мікродомени (рафти, плоти) є основними модуляторами геометрії мембран, латеральних переміщень молекул, трафіку і передачі сигналу через плазматичну мембрану. Вони надають різні фізичні властивості клітинній мембрані, змінюючи її плинність в залежності від структури, а саме кількості холестерину, сфінголіпідів та фосфоліпідів [371, 372]. Показано, що змінені рівні мембранного холестерину та збагачені холестерином мембрани впливають на агресивність і прогресування раку [373].

У канцерогенезі спостерігається метаболічний вплив ракових клітин на мікрооточення пухлин [374, 375]. Важливими медіаторами пухлинного метаболізму вважають білки шляху гіпоксії, які мають вплив як на пухлинні клітини, так і на мікрооточення [115, 376]. Метаболічний вплив відбувається різними шляхами, серед яких секреція лактату, що пригнічує імунні клітини, впливає на міграцію моноцитів [377], сприяє поляризації макрофагів з їх переходом до запального M2 фенотипу так званих пухлино-асоційованих макрофагів, які приймають участь в імуносупресії [378]. Лактат сприяє стабілізації та накопиченню HIF1 α , посилюючи гіпоксичні ефекти. HIF1 α в свою чергу регулює експресію гліколітичних ензимів та індукує експресію LDH, що призводить до перетворення пірувату у лактат та інгібує TCA завдяки підвищенню експресії PDK [376, 379]. Крім того лактат активує сигналізацію

NF- κ B і PI-3 кінази в ендотеліальних клітинах, а також індукує секрецію проангіогенного фактора VEGF з пухлино-асоційованих стромальних клітин [380] та стимулює секрецію гіалуронової кислоти пухлино-асоційованими фібробластами, яка сприяє метастазуванню ракових клітин [317, 381]. Наступний метаболіт, який секретується раковими клітинами – кінуренін. Він має певні токсичні ефекти та сприяє диференціації Т-клітин у супресивні Т-регуляторні клітини [382.]. Інші аспекти пухлино-стромальних взаємодій будуть розглянуті далі.

1.2.2. Епітелійно-мезенхімний перехід у прогресії та метастазуванні пухлин. Епітелійно-мезенхімний перехід (ЕМП) - це клітинна програма, яка, як відомо, має кардинальне значення для ембріогенезу, запалення та загоєння ран і злоякісної прогресії [383, 384].

З ранніх стадій ембріонального розвитку клітини епітелійного та мезенхімного походження необхідні для формування структури та функції органів, що розвиваються. Однак ці фенотипи не завжди є постійними, і у відповідних умовах, епітелійні і мезенхімні клітини здатні перетворюватися між цими двома фенотипами. Ці процеси називаються епітелійно-мезенхімним переходом (ЕМП), та зворотній - мезенхімно-епітелійний перехід (МЕП), які необхідні для створення структури і морфогенезу [385]. Схематично ці процеси зображено на рис. 1.1 з характеристикою основних молекулярних властивостей згідно даних Донгре А. та Вайнберга Р. [384] з доповненнями.

Епітелійні клітини мають між собою та базальною мембраною специфічні з'єднання, а саме щільні контакти, десмосоми, гемідесмосоми та адгезивні контакти. По мірі набуття мезенхімного фенотипу ці контакти зникають, як і базально-апикальна поляризація клітин. Нормальні та неопластичні епітелійні клітини, які активували програму ЕМП, дуже рідко переходять до повністю мезенхімного стану. Зазвичай вони переходять до частково епітелійного і частково мезенхімного стану, в якому вони експресують суміш маркерів та мають перехідний фенотип [384, 386].

ЕМП і МЕП є основними ембріологічними механізмами ремоделювання

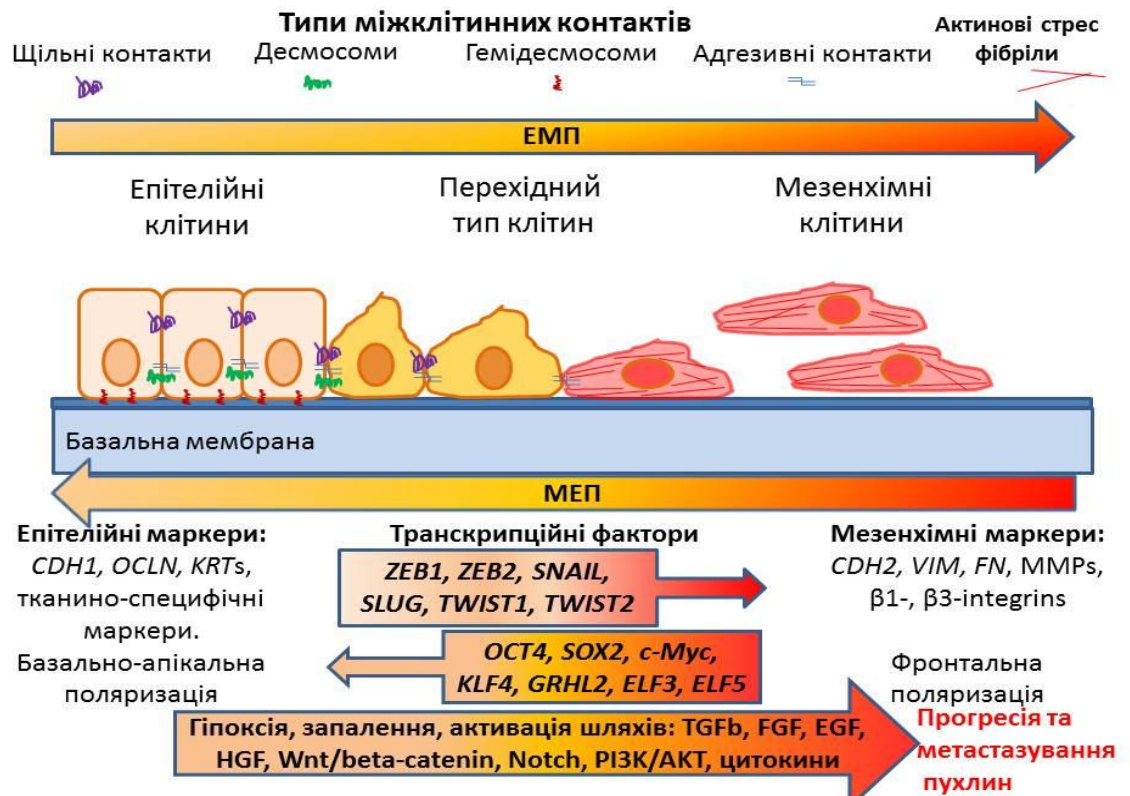


Рис. 1.1. Молекулярні та фенотипові характеристики клітин при епітелійно-мезенхімному (ЕМП) й мезенхімно-епітелійному переході (МЕП) [384] та рушійні фактори ЕМП

тканин, як при гастрюляції, так і при формуванні зародкових сегментів [387, 388]. Згідно цих досліджень процес ЕМП фенотипово складається з декількох етапів [389, 390]. По-перше, прикріплені епітелійні клітини втрачають адгезивні властивості і розпадаються з втратою епітелійних маркерів, таких як Е-кадгерин, окклюдин, цитокератини, і появою експресії мезенхімних маркерів, таких як N-кадгерин, віментин, фібронектин. Далі спостерігається втрата базально-апикальної поляризації та придбання фронтальної поляризації (передньої та задньої частин). Потім цитоскелет цих клітин піддається ремоделюванню зі змінами корових актинів і актинових стресових фібрил. Нарешті, адгезія клітини-міжклітинний матрикс змінюється, з активацією протеолітичних ферментів, таких як матричні металопротеази (MMPs). Слід зазначити, що процес метастазування при епітелійному раку також складається з декількох етапів [391, 392]. А саме, клітини відділяються від первинної

пухлини і вторгаються в навколишню строму пухлини. Далі вони входять до судин і досягають нових метастатичних ділянок. Тому процес ЕМП під час прогресування раку та метастазування нагадує процес, що спостерігається в ембріологічному розвитку. Відповідно, молекулярні тести, засновані на ЕМП в ембріології, знайшли своє застосування для вивчення прогресування раку та його метастазування [393-395].

Відрізняють 3 типи ЕМП згідно їх біологічного процесу який відбувається [383, 384]. Перший тип ЕМП, пов'язаний з імплантацією, формуванням ембріонів і розвитком органів, метою якого є формування різнорідних типів клітин, які мають спільні мезенхімні фенотипи. Він не викликає фіброзу, та не індукує інвазивного фенотипу [396]. Другий тип ЕМП пов'язаний із загоєнням ран, регенерацією тканин і фіброзом органів. У ньому ЕМП програма починається як частина події, пов'язаної з репарацією, яка зазвичай генерує фібробласти та інші споріднені клітини, щоб реконструювати тканини після травми та запальної травми. Однак, на відміну від ЕМП 1 типу, 2 тип пов'язаний з запаленням і припиняється після його послаблення. При фіброзі органів ЕМП 2 типу може продовжувати реагувати на запалення, що призводить до руйнування органів [397]. Фіброз тканин є по суті незмінною формою загоєння ран внаслідок стійкого запалення. Фіброз органів, який відбувається в низці епітелійних тканин, опосередковується запальними клітинами і фібробластами, які вивільняють різноманітні запальні цитокини, а також компоненти екстрацеллюлярного матриксу, що включає колагени, ламініни, еластин і тенацини. Свої специфічні особливості цього процесу виявлено у таких органах, як нирки, печінка, легені і кишечник [398, 399]. Хронічні фібрози потенційно є джерелом для розвитку пухлин, враховуючи появу міофібробластів та вогнищ хронічного запалення й надлишкову кількість колаген-збагаченого екстрацеллюлярного матриксу [400, 401].

ЕМП 3 типу характерний для неопластичних клітин, які раніше придбали генетичні та епігенетичні зміни, зокрема в генах, які сприяють клональному розмноження і розвитку локалізованих пухлин [383]. Ці зміни, зокрема,

впливають на онкогени та гени супресорів пухлин, які у свою чергу змінюють регуляторні шляхи ЕМП, що значно відрізняється від тих, що спостерігаються у двох попередніх типах ЕМП. Клітини карциноми, що піддаються ЕМП типу 3, можуть прогресувати та створювати віддалені метастази і тим самим генерувати кінцеві, небезпечні для життя прояви раку. Важливо відзначити, що ракові клітини можуть проходити через ЕМП до різних ступенів, при цьому деякі клітини зберігають багато епітелійних ознак (квазі-мезенхімні клітини), тоді як інші клітини стають повністю мезенхімними. Досі незрозуміло, які конкретні сигнали індукують ЕМП 3 типу в клітинах карциноми. Наприклад, такі сигнали можуть виникати в стромі пухлини, яка пов'язана з багатьма первинними карциномами. Велика кількість запальних клітин, інфільтруючих пухлини, а також наявність гіпоксії у тканинах, де прогресують пухлини, наявність великої кількості стовбурових клітин, що присутні в пухлинному мікросередовищі, такі як ракові стовбурові клітини, мезенхімні стовбурові клітини, все це може бути індукторами ЕМП в пухлинних клітинах. [402, 403]. У випадку багатьох карцином, ЕМП-індукуючі сигнали, що виникають з асоційованої з пухлиною стромою активують сигнальні шляхи, зокрема HGF, EGF, PDGF, і TGF- β , Wnt, Notch. ЕМП-індукуючі сигнали (гіпоксія, запалення, тощо), є відповідальними за функціональну активацію в ракових клітинах низки транскрипційних факторів-індукторів ЕМП, зокрема Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist, Smads, Goosecoid і FOXC2 [404-407], рис. 1.2. Після активації експресії кожен з них може діяти різними шляхами для поглиблення складної програми ЕМП [408]. Ці транскрипційні фактори взаємодіють один з одним та з іншими, щоб забезпечити перехресні зв'язки між відповідними сигнальними шляхами [409, 410]. Фактична реалізація програми ЕМП залежить від низки внутрішньоклітинних сигнальних мереж. Вони включають білки ERK, MAPK, PI3K, Akt, Smads, NF- κ B, RhoB, β -катенін, що передають сигнали, фактор зв'язування лімфоїдного ехансера (LEF), Ras і c-Fos білки, а також шляхи рецепторів, таких як β 4 інтегрини, α 5 β 1 інтегрин і α V β 6 інтегрин [383, 411, 412].

Хоча ці три типи ЕМП відносяться до різних біологічних процесів, в їх основі лежить загальний набір генетичних та біохімічних елементів, що реалізують ЕМП. Однак ЕМП при розвитку раку є найбільш мінливим та непередбаченим [383, 384]. Згідно експериментальних результатів багатьох дослідників створено базу даних, до якої входять більш ніж 370 генів, що приймають участь у ЕМП при прогресуванні та метастазуванні пухлин [413]. За допомогою цієї бази можна проаналізувати пухлино-асоційовані мутації для різних типів раку та можливі білок-білкові взаємодії при ЕМП, а також отримати діаграми взаємодій генів та кореляційні зв'язки для різних форм раку. Інша база даних ЕМП-регулом [414] всебічно аналізує взаємодії між регуляторами і мішенями, включаючи транскрипційні фактори та їх мішені, miRNA-мішень, miRNA-lncRNA, транскрипційні фактори-lncRNA і транскрипційні фактори-miRNA. Завдяки цим даним ідентифіковано 10 типів взаєморегулювання процесу ЕМП у всіх трьох типах ЕМП згідно їх біологічного процесу.

В останні роки багато робіт присвячено вивченню особливостей ЕМП, участі сигнальних шляхів та прогресії пухлин різного походження для пошуку мішеней для терапії та потенційних біомаркерів для діагностики і прогнозування захворювання. Так, для світлоклітинних карцином нирки показана центральна роль TGF β , головного індуктора ЕМП, та транскрипційного фактора Smad у розвитку та прогресії цього типу пухлин наряду з TGF β активуючим впливом у меланомах та раку молочної залози [415-417]. За результатами широкомасштабного дослідження раку передміхурової залози виявлено ключові індуктори ЕМП, серед яких TGF β 1, BMP, IL6, FGF, Wnt/b-catenin, онкогенні ізоформи AR, які пов'язаних зі специфічними сигнальними шляхами та їх регуляцією [418]. Для раку легені показано, що втрата експресії E-cadherin, та підвищення HIF-1 α , TWIST, SNAILs пов'язані з поганим прогнозом для хворого [419]. Крім того, підвищення експресії транскрипційного фактора *FOXM1* сприяє метастазуванню немілоклітинного раку легені шляхом індукції ЕМП через активацію шляху AKT/p70S6K

[420]. Цей транскрипційний фактор є критичним і для прогресії карциноми печінки [421]. Відомо, що для раку товстого кишечника важливу роль у процесі ЕМП грає Wnt/b-catenin сигнальний шлях, який може активуватись у тому числі завдяки підвищенню експресії нуклеолярного ГТФ-зв'язуючого білка GNL3, що призводить до посилення проліферації, міграції та інвазії ракових клітин [422]. Встановлено, що ЕМП відіграє важливу роль в хіміорезистентності раку яєчника, а інгібування процесу ЕМП може бути вдалим вибором для успішного лікування цього виду раку [423]. Серед шляхів, асоційованих з ЕМП, що задіяні у резистентності до хіміотерапії, фігурує p53, вплив на який реалізується через Snail та Slug. Їх активація обумовлює резистентність до препарату Паклітаксел [424]. EGFR/Stat3 через віментин створюють резистентність до цисплатину [425], а TGF β опосередковано через ZEB1 та Notch3/ERK інгібуючи *CDH1*, та навпаки активуючи Snail, Slug та SMA обумовлюють резистентність до карбоплатину [426, 427]. Отже, різні види раку та ступені їх прогресії дають свій внесок у особливості ЕМП та силу проявів патологічних ефектів.

Багато досліджень показали важливий вплив епігенетичних механізмів у реалізації програми ЕМП при прогресії та метастазуванні пухлин. Серед них модифікації хроматину, метилювання геномної ДНК, вплив некодувальних РНК (як довгих, так і мікроРНК) [428-430]. Епігенетична репресія експресії гена епітеліального маркера Е-кадгерину була добре охарактеризована. Зокрема, три головних репресори транскрипції Е-кадгерину родин Snail, ZEB і Twist, також відомі як ЕМП-індукуючі фактори транскрипції, відіграють вирішальну роль у цьому процесі шляхом взаємодії з декількома епігенетичними модифікаторами [431]. Зокрема показана здатність транскрипційних факторів Snail, ZEB рекрутувати метилювальні ензими (DNMTs) до промотору Е-кадгерину з метою його метилювання та втрати ним експресії [432, 433]. Крім того ЕМП-індукуючі транскрипційні фактори здатні впливати й на процес модифікації гістонів. Так, SNAI1/2 здатні безпосередньо активувати транскрипцію гена *TGFBR2*, підвищуючи ацетилювання H3K9 на промоторі, що веде до активації TGF β сигнального шляху та активує ЕМП [434].

Індукований транскрипційним фактором ZEB1 ЕМП супроводжується репресією декількох інших епітелійних генів (окрім *CDH1*), включаючи *EPCAM*, *ST14*, *ESRP1* і *RAB25* разом зі зниженим ацетилюванням H3K9 і H3K27 на їх промоторух. Також спостерігалось глобальне деацетилювання H3K27 при ZEB1-індукованому транскрипційному перепрограмуванні [435, 436]. Відомо, що транскрипційний фактор TWIST1 взаємодіє з різними ферментами, що модифікують хроматин. Серед них TWIST безпосередньо взаємодіє з Mi2 β , MTA2 і RbAp46 і, ймовірно, спрямовує комплекс NuRD для деацетилювання гістонів і ремоделювання хроматину на промоторі E-кадгерину. Ці епігенетичні події разом призводять до репресії експресії епітелійних генів і сприяють ЕМП та метастазуванню ракових клітин [437, 438]. Ці та інші епігенетичні модифікатори є критичними регуляторами розвитку раку і розглядаються як нові терапевтичні мішені для лікування раку людини [428, 439].

На додаток до різних білків, що модифікують хроматин, важливу роль у регуляції ЕМП відводиться декільком класам некодувальних РНК в регуляції транскрипції. Кожен транскрипційний фактор, що приймає участь у ЕМП має власні регуляторні мікроРНК, які впливають на його експресію [440]. Десятки мікроРНК були ідентифіковані як мішені 3'UTR мРНК транскрипційних факторів ZEB1 та ZEB 2 для пригнічення їх експресії в різних ракових клітинах [441], у той час як п'ять членів родини miR-200 є значними регуляторами диференціації та епітелійних характеристик багатьох типів клітин і тканин [442, 443]. Інша мікроРНК, пов'язана з взаємодією з факторами транскрипції генів ZEB, це miR-139-5p, яка взаємодіє з обома факторами при гепатоцелюлярній карциномі, й її інактивація сприяла ЕМП, міграції та інвазії в клітинах Her3В та SMMC7721 [444]. Також виявлено, що ген *ZEB1* є безпосередньою мішенню miR-23b, що призводить до стимулювання міграції та інвазії раку сечового міхура [445]. Цікаво відмітити, що мРНК генів *SNAI1* та *SNAI2* безпосередньо є мішенями для членів сімейства miR34 у різних ракових клітинах, тоді як експресія самих miR34s позитивно регулюється p53 дикого типу. Ці результати

свідчать про регуляторну вісь *miR34-SNAI1/2* в індукованому ЕМП, пов'язаному з функцією гена-супресора росту пухлин *TP53* [446].

Дуже багатогранний та різноплановий вплив на розвернення програми ЕМП та прогресування й метастазування пухлин мають довгі некодувальні РНК. Цей вплив реалізується різноманітними механізмами включаючи координацію динаміки хроматину, регуляцію метилювання ДНК, модуляцію інших некодувальних РНК і стабільність мРНК, а також контроль доступності епігенетичних субстратів за допомогою зміненого метаболізму пухлини [270, 271, 447]. Наприклад, у клітинах раку молочної залози *lncRNA-ROR* сприяє ЕМП і метастазуванню *in vitro* та *in vivo*, інгібуючи *mir-205*-опосередковану репресію *ZEB2*, виявляючи перехресний зв'язок між *lncRNA* і *miRNA* [448]. Крім того ця некодувальна РНК опосередковує резистентність до хіміопрепарату Доксетаксел при раку легені [449].

Довга некодувальна РНК *ncRNA-a7* (також відома як *treRNA*) функціонує як енхансер та сприяє транскрипції сусіднього гена *SNAI1*, який є одним з індукторів ЕМП [450]. *lncRNA SchLAP1* перешкоджає взаємодії з хроматином комплексу ремоделювання *SWI/SNF* і пригнічує експресію цільових генів при раку передміхурової залози, що є критичним для інвазивності та метастазування пухлин [451]. Інша довга некодувальна РНК гена *HOTAIR*, яка асоційована з метастазами та поганим прогнозом [452, 453], виступає модулятором хроматину завдяки взаємодії з ферментами *PRC2* та *LSD1*, що модифікують гістони. У результаті спостерігається зниження експресії генів *HOX* і багатьох генів-супресорів метастазів [454]. Серед 600 *lncRNA*, що мають зміни експресії при розвитку ЕМП завдяки індукції *TGF-β* шляху, *lncRNA-NIT* інгібує експресію Е-кадгерину, що сприяє посиленню ЕМП та метастазуванню раку молочної залози, однак механізм впливу цієї РНК невідомий [455]. Модифікації хроматину, епігенетична регуляція, альтернативний сплайсинг і трансляційний контроль за допомогою *MALAT1*, *HOTAIR* і *TRE lncRNA* являють собою важливі приклади *lncRNA*-опосередкованого контролю міграції та інвазії клітин, ЕМП і метастазів [456].

Отже, ЕМП спостерігається у багатьох видах раку, таких як рак молочної залози, яєчника, товстої кишки, легені, передміхурової залози, сечового міхура, і пов'язаний з поганим прогнозом і метастазуванням, крім того він опосередковує стійкість до цитотоксичних методів лікування. Вивчення механізмів та шляхів активації та інгібування цього процесу необхідно для кращого розуміння прогресування раку, що може призвести до розробки нових терапевтичних та прогностичних стратегій лікування раку [457].

1.2.3. Характеристика пухлино-стромальних взаємодій. Пухлино-стромальні взаємодії представляють собою взаємний вплив (перехресний діалог) між раковими та супутніми клітинами строми й їх взаємодію з позаклітинним матриксом (ПКМ), що є аспектом взаємодій пухлина-організм в цілому [42-44]. Взаємодії генетично змінених пухлинних клітин і ПКМ, з одного боку, і реактивних стромальних клітин, з іншого боку, суттєво контролюють більшість аспектів розвитку пухлин, таких як ЕМП, міграція, інвазія, утворення метастазів, неоваскуляризація, апоптоз і стійкість до хіміотерапії [47]. Такі впливи та взаємодії опосередковуються хемокінами, розчинними факторами з ферментів, зокрема металопротеїназами, факторами росту (такими як TGF β , PDGF, VEGF, HGF EGF, FGF), позаклітинними везикулами (зокрема екзосомами), некодувальними РНК [48-51].

Клітинні елементи реактивної пухлинної строми представляють гетерогенну популяцію, яка може знаходитись у різних співвідношеннях та бути представлена фібробластами та пухлино-асоційованими фібробластами, макрофагами та пухлино-асоційованими макрофагами (ПАФ), перицитами, ендотеліальними клітинами, мезенхімними стовбуровими клітинами, раковими стовбуровими клітинами, дендритними клітинами, іншими клітинами імунної системи: різними субпопуляціями Т-лімфоцитів (Th1, Th2, Th17, Treg), В-лімфоцитами, еозинофілами, базофілами, нейтрофілами, субпопуляціями НК-клітин [458-462]. Насьогодні не існує єдиної класифікації або номенклатури для реактивної пухлинної строми. Серед всіх цих клітинних популяцій розрізняють пухлино-асоційовані фібробласти, мезенхімні стромальні клітини та фіброцити

[463]. Інші дослідники диференціюють принаймні шість різних клітинних джерел серед пухлино-асоційованих стромальних клітин, що приймають участь у розвитку пухлин та метастазуванні: фібробласти, перицити, мезенхімні стромальні клітини кісткового мозку, адипоцити, макрофаги і імунні клітини [461, 464-466].

Значну увагу у дослідженні реактивної пухлинної строми спрямовано на вивчення особливостей та гетерогенності ПАФ як клітинних елементів, які безпосередньо контактують з пухлинними клітинами й регулюють багато процесів канцерогенезу, а також як головних «скульпторів» позаклітинного матриксу [45, 46, 467]. На відміну від нормальних фібробластів, ПАФ характеризуються чіткими властивостями, включаючи більшу швидкість проліферації, посилену продукцію колагена, факторів росту і модуляторів ПКМ, стимулювання росту пухлинних клітин при спільному культивуванні з раковими клітинами [468]. Більш того, ПАФ відрізняються від нормальних фібробластів або інших тісно пов'язаних з ними типів клітин експресією низькоспецифічних маркерів, серед яких гладкий α -актин (*ACTA2*), віментин (*VIM*), специфічний білок фібробластів (*FSP*) і білок активації фібробластів (*FAP*), тромбоспондин-1 (*TSP-1*), тенасцин с (*TNC*), рецептори тромбоцитарного фактора росту- α і - β (*PDGFRA* і *PDGFRB*), та інші [469-471]. ПАФ експресують і деякі маркери пов'язані з ангиогенезом, серед них фактор росту фібробластів-2 (*FGF2*), фактор росту ендотелію судин (*VEGF*) і ангиопоетин-1 (*Ang-1*) [472, 473]. Низка факторів росту, що експресуються та секретуються фібробластами, підтримують проліферацію пухлин і прогресування, це EGF, HGF/SF, IL-6, FGF2 [474]. Крім того, ПАФ експресують матриксні металлопротеїнази-1 і -3 (*MMP1*, *MMP3*), продукують колагени і вивільняють цитокіни (*IL-6*, *IL-8*) і хемокіни (*CXCL12*, *CXCL8*, *CXCL14*, *CCL5*, *CCL2*, *CCL7*); всі вони роблять внесок у активацію росту пухлин та метастазування [45, 463, 475, 476]. Останні дослідження показали регуляторну функцію ПАФ відносно рекрутування моноцитів опосередковане моноцитарним хемотаксичним білком-1 (*MCP-1*), а також цитокінів фактора-1

(SDF-1) у зону розвитку пухлини та вплив на поляризацію макрофагів у M2 макрофаги, які виконують імуносупресивну роль через осі PD-1 [477].

Відомо, що у реактивній пухлинній стромі широко представлені пухлино-асоційовані макрофаги (ПAM), які представляють собою поляризовані протизапальні M2 макрофаги з пухлино-стимулюючими та імуносупресивними властивостями та являються маркерами поганого прогнозу [478-480]. ПAM змінюють свій метаболізм, налагоджують взаємодії з ПАФ та експресують RCAS1, B7-H4 й інші молекули імуно-супресивного профілю мікрооточення раку та приймають участь у реконструкції ПКМ, що дає можливість як локального поширення пухлин, так і створення метастазів [481, 482].

Вивчення імуносупресивного пухлинного оточення 33 видів раку виявило шість підтипів імунних особливостей, а саме ранозагоювальний, IFN- γ домінуючий, запальний, збіднений лімфоцитами, імунологічно спокійний і TGF- β домінуючий. Ці підтипи характеризуються відмінностями в макрофагальних або лімфоцитарних сигнатурах, співвідношеннями Th1 Th2 клітин, ступенем внутрішньо пухлинної гетерогенності, анеуплоїдією, ступенем неантигенного навантаження, загальною проліферацією клітин, експресією імуномодулюючих генів і, відповідно, прогнозом для хворого [483].

Строма є значною частиною мікрооточення пухлини. Завдяки своїй складності вона може впливати як на рак, так і на імунні клітини в їх поведінці та взаємодіях [484, 485]. Окрім розчинних продуктів, що виділяються стромальними і раковими клітинами, компоненти ПКМ все частіше визнаються більш ніж просто незначними гравцями в конституції, розвитку та регуляції мікрооточення пухлини. Зміни в архітектурі сполучного каркаса, індуковані перетворенням TGF β , активності лизилоксидази і металопротеїназ (MMPs), створюють різні умови щільності та жорсткості ПКМ [486, 487]. Вони завдяки різним механізмам впливають на імунні клітини, зокрема створюють фізичні бар'єри, модулюють вивільнення збереженого TGF- β 1. Вплив ПКМ на мезенхімні клітини виражається у сприянні їх переходу до міофібробластів, на епітелійні клітини, шляхом активації ЕМП. Для ракових та стовбурових

ракових клітин ПКМ посилює прогресування до метастатичного фенотипу [488]. На стовбурові клітини ПКМ може впливати як активатор диференціації, що залежить від характеристик мікрооточення. ПКМ грає важливу роль від фізіологічних механізмів процесу загоєння ран, та механізмах фіброзу в деяких хронічних патологіях, до дерегульованих механізмів біології раку [489].

Основними компонентами ПКМ є колагени, які складають приблизно 30% від загального складу ПКМ, та представлені 28 різними колагенами [490]. Добре відомо, що при канцерогенезі солідних пухлин відбувається руйнування базальної мембрани яка є важливим елементом підтримання епітелійного стану клітин та механізмів її відновлення за рахунок колагенів IV та VIII типів [491, 492]. Менше відомо про вплив на пухлини інших типів стромальних колагенів, серед яких фібрилярні колагени типу I, II, III, V, XI, XXIV і XXVII, а також колаген типу VI, які секретуються ПАФ та грають важливу роль у пухлино-асоційованому фіброзі (десмоплакії), що сприяє формуванню імуносупресивного оточення, розвитку пухлин та метастазуванню [493].

Іншою складовою частиною ПКМ є гіалуронан (ГА), який являється високомолекулярним глікозаміногліканом, що має значну роль в рості пухлини і метастазуванні [494, 495]. Він може діяти і як супресор пухлини і як промотор прогресії в залежності від молекулярної маси [496]. Виявлено, що гіалуронан через свій рецептор CB44 впливає на стовбурові властивості та виживання пухлинних стовбурових клітин [497]. Молекулярна маса гіалуронану залежить від активності матричних ферментів гіалуронідаз (HYALs), які деградують високомолекулярний гіалуронан. Слід відмітити, що гіалуронідази-1 та -2 (HYAL1, HYAL2) в даний час є найбільш вивченими в канцерогенезі [498]. Гіперекспресія HYAL1 була пов'язана з більш агресивними пухлинами в різних епітелійних раках (наприклад, раку сечового міхура, колоректального, молочної залози та яєчника), тоді як HYAL2 може функціонувати і як супресор та промотор пухлинного росту [51, 499, 500].

Клітини строми відіграють значну роль у забезпеченні або підвищенні можливостей низких характерних ознак в мікрооточенні пухлин. Це є підґрунтям

для стратегій таргетної терапії, спрямованих на скасування впливу реактивної пухлинної стромы. Орієнтація на пухлино-асоційовані фібробласти, макрофаги, ангиогенез і посилення імунної відповіді можуть представляти собою окрему парадигму лікування раку людини в найближчому майбутньому [501].

1.3. Сучасні підходи до пошуку молекулярних аберацій при канцерогенезі

1.3.1. Широкомасштабний пошук генетичних та епігенетичних змін та порушення експресії генів у раках людини. Останніми десятиріччями у світі розроблено низку технологій широкомасштабного скринінгу різномірних порушень низки патологій людини, у тому числі онкологічних захворювань людини [502, 503]. Вони включають технології мікропанелей (ДНК, РНК, білки) [9, 504-506], секвенування нового покоління як повногеномні, повнотранскриптомні (екзом, мРНК, нкРНК) й епігеномні [8, 507, 508], дослідження мікробіому при онкозахворюваннях [509-511], мас-спектрометричні технології нового покоління [512].

Завдяки цим дослідженням є можливість встановлювати різномірні порушення при розвитку різних видів раку та метастазуванні й оцінювати ефективність лікування хворих завдяки виявленню генетичних змін (мікросателітної нестабільності, варіації одонуклеотидних поліморфізмів та мутацій й варіації копій генів), епігенетичних змін (метилування ДНК, модифікації гістонів, мікроРНК) та диференційну експресію генів на різних стадіях пухлинного процесу [513, 514]. Секвенування нового покоління дозволяє встановлювати «мутаційні відбитки» різних канцерогенів, що дозволяє виявляти вплив екзогенних та ендогенних генотоксичних агентів [515], а також говорити про нове покоління генотоксичних тестів [516].

Широкомасштабні геномні дослідження і технологічні нововведення секвенування нового покоління виявили багато деталей соматичних і гермінальних мутацій у солідних пухлинах. Такий підхід дає можливість

класифікувати підтипи пухлин на основі генетичних змін у солідних пухлинах, і на основі цієї інформації підбирати пацієнтам нові препарати та цільові терапії й корегувати стандартне лікування [517, 518]. На базі цих даних створюють специфічні набори для дослідження та клінічного скринінгу мутацій, ампліфікацій, транслокацій у солідних пухлинах [519-521].

У Японії та США Національні онкологічні центри і університетські лікарні запровадили діагностичне тестування пацієнтів на рак методом секвенування нового покоління. Виходячи з виявлених молекулярних змін, лікарі можуть забезпечити затверджену цільову терапію та доступ до досліджуваних препаратів для онкологічних хворих. Однак, інтерпретація клінічного значення геномних змін залишається найважчим вузьким місцем доказової медицини при раку не дивлячись на бази даних для інтерпретації пухлинних змін і клінічних рішень [518, 522, 523]. Профілювання ДНК пухлини в даний час є новим стандартом у дослідженні та лікуванні раку [524].

Хоча широкомасштабні дослідження секвенування нового покоління раку мають перспективу для забезпечення доказової онкології, проблеми залишаються в інтеграції цих даних з клінічно підтвердженими біомаркерами, тому актуальним є створення інтегрованої платформи для аналізу виявлених змін на мультиомному рівні [525]. Один з важливих аспектів окрім точної діагностики, прогнозу перебігу захворювання, які також можна аналізувати завдяки мультиомним даним [526, 527], є встановлення чутливості до хіміотерапевтичних препаратів як мішенних, так і загальної дії. Цю проблему більш доказово та комплексно можна вирішити завдяки не тільки геномному статусу стосовно цільового препарату, а на рівні мультиомних досліджень з використанням машинних методів навчання та визначення класифікаторів для прогнозування ефективності ліків [528, 529].

Для персоніфікованої медицини та широкого загалу хворих ці технології поки є ще досить дорогими, але завдяки ним стає можливим виявлення особливостей певних пухлин, молекулярних підтипів раків, встановлення більш точного діагнозу та прогнозу захворювання, валідація вже відомих, відкриття

потенційних біомаркерів, ліків, мішеней, та розробка нових терапевтичних підходів лікування раку [530].

1.3.2. Виявлення біомаркерів для діагностики та мішеней для таргетної терапії епітелійних пухлин. Насьогодні у різних людських популяціях напрацьовано великий об'єм даних стосовно особливостей канцерогенезу багатьох типів пухлин на усіх рівнях організації, починаючи від генетичних, епігенетичних порушень, змін експресії генів, закінчуючи метаболомним перепрограмуванням організму, що аналізувалось нами вище [506, 513, 524]. Ідеальною ситуацією для пошуку біомаркерів є знаходження специфічного генетичного, епігенетичного порушення або гена, продукт якого експресується лише при певній патології, у даному випадку якомусь виді раку, але до сих пір жодної на 100% специфічної зміни не виявлено. Ця ж ситуація спостерігається й для мішеней для терапії онкологічних захворювань. Тобто не виявлено однієї специфічної мішені, від інгібування або реекспресії якої у всіх хворих на якийсь тип раку залежить успіх у лікуванні. Тому останнім часом йде мова про персоналізовану діагностику та лікування, враховуючи індивідуальні особливості процесу канцерогенезу та стану організму людини [531]. У сучасній біології, експериментальній та клінічній медицині відомі наступні загальні типи біомаркерів та панелей біомаркерів: ДНК-біомаркери, епігенетичні біомаркери, РНК-біомаркери, транскриптомні, протеомні та інтегратомні біомаркери [532].

Відомо 5 основних функцій біомаркерів / панелей біомаркерів у клінічній практиці. Вони відіграють важливу роль у діагностиці різних захворювань людини і тварин, оцінці їх тяжкості та ризиків, прогнозуванні впливу лікарських засобів і чутливості до ліків, а також відповіді на лікування. Остання функція - моніторинг захворювань та патологічних впливів на організм [533-535]. Первинні результати, які дають біомаркери та їх набори, відповідають чотирьом значенням, що є основою діагностичної матриці. Два з них дають наявність захворювання: істинний позитивний (t +) і помилковий (f-). Два інших значення характеризують відсутність захворювання: істинний

негативний (t) і помилковий позитивний (f +). Ці значення формують Таблицю спряженості. Кілька діагностичних параметрів, що характеризують діагностичну цінність досліджуваних біомаркерів, отримані з цих чотирьох значень. Серед них чутливість (Se), специфічність (Sp), точність (Ac), поширеність, прогностична цінність (позитивна (PPV) і негативна (NPV)), коефіцієнт правдоподібності (позитивний (LHR +) і негативний (LHR-)), графік залежності чутливості від хибно позитивних висновків (крива ROC) і площі під ROC (AUC^{ROC} , так званий індекс C), діагностичне співвідношення ризиків (OR) та інші. Різні дослідники та різні статистичні підходи використовують різні комбінації цих параметрів у оцінці біомаркерів [536]. Але необхідними параметрами з них є Se, Sp, Ac, PPV + і PPV-, та / або LHR + і LHR-, та / або OR [537]. Графічним способом представлення інформації LHR-даних є аналіз кривої ROC.

Сьогодні відома низка статистичних тестів, програм і підходів, які розраховують деякі з цих діагностичних параметрів для одного потенційного біомаркера або набору біомаркерів. Багато з них не є вільними у доступі для дослідників деякі з них розроблені центрами біоінформатики для конкретних завдань і не можуть використовуватися для інших цілей [538, 539]. Досі немає офіційно схвалених STARD (стандартна звітність про точність діагностичних досліджень) методів для встановлення, підтвердження та перевірки транскриптомних діагностичних біомаркерів [540]. Хоча інша організація, REMARK, намагалась описати рекомендації щодо звітності прогностичних досліджень пухлинних маркерів [541]. Але загальноприйнятих стандартів не існує досі.

Останнім часом методи машинного навчання, які описуються байєсовським статистичним підходом, широко використовуються для моделювання та оцінки генетичних, епігенетичних, фармакогеномних взаємодій у багатофакторних захворюваннях та оцінки біомаркерів різних типів [542]. Ці методи використані зокрема у PanelomiX, ROC і MDR [543-545]. Вони

є перспективними підходами для розробки панелей біомаркерів та пошуку класифікаторів для оцінки ефектів таргетної терапії онкологічних захворювань.

Отже, сучасний рівень розвитку науки і медицини дозволяє говорити про значні досягнення у розумінні молекулярних механізмів канцерогенезу, розробки новітніх методів діагностики та прогнозування різних видів раку, впровадження ефективних для певних типів пухлин терапевтичних підходів, включаючи імунотерапію. Але не дивлячись на всі ці успіхи актуальною задачею експериментальної та клінічної онкології, та суміжних наук, таких як молекулярна біологія, генетика, клітинна біологія та інші, є й розкриття механізмів пухлинного росту та методів впливу на цей процес, пошук генетичних, епігенетичних, експресійних особливостей певних пухлин, пухлино-стромальних взаємодій, та молекулярних підтипів й мішеней для терапії з метою запобігання росту та розповсюдженню пухлин, розробки панелей біомаркерів для діагностики та прогнозування захворювання на рак.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Хімічні реактиви та реагенти

В даній роботі використовували наступні реактиви: розчин для виділення тотальної РНК TRI Reagent фірми “Sigma-Aldrich”, США, реактиви та набори фірми “Thermo Scientific”, США: набір для синтезу першого ланцюга кДНК (RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase kit), інгібітор РНКаз RiboLock, ДНКаз I, 2х суміш для кількісної полімеразно-ланцюгової реакції (кПЛР) SYBR Green Master mix, 2х суміш для електрофорезу РНК 2xRNA Loading Dye, лігаза та буфери для лігування, плазмідні вектори для клонування рTZ57R/T. Також використовували; рестриктази NotI, Sau3AI, лігаза та буфери для рестрикції та лігування фірми “NEB“, Велика Британія, суміш для кількісної полімеразно-ланцюгової реакції Eva Green 5xmaster mix фірми SolisBioDyne.

Середовища для культивування клітин DMEM, IMDM/RPMI ембріональна бичача сироватка, антибіотики і трипсин фірми Gibco (“Thermo Scientific”, США). Для трансфекції клітин використовували реагенти Lipofectamine і Plus Reagent (Invitrogen, CA, США).

Праймери для кількісної полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), а також для кількісної ПЛР (кПЛР) були синтезовані на фірмі “Invitrogen, LifeTechnologies”, США.

Антитіла для імуногістохімії мишачі для генів TGFB1, PLAУ, FOS, IL1b та TAGLN та вторинні кролячі антимишачі антитіла (Abcam та Santa Cruz Biotechnology, США).

2.2. Біологічні матеріали

2.2.1. Зразки тканин епітелійних пухлин. В роботі використано швидко заморожені у рідкому азоті зразки біопсій та хірургічно видаленого матеріалу пухлин яєчника, нирки, кишечника, передміхурової та молочної залози (аденокарциноми, аденоми), а також парних умовно-нормальних тканин (УНТ). Зразки отримано з Національного Інституту раку та Інституту урології НАМН України. Одразу після видалення зразки заморожували в рідкому азоті із подальшим зберіганням у низькотемпературному холодильнику при температурі -70°C . Зразки пацієнтів отримано згідно з принципами Гельсинської декларації. Низка пухлин люб'язно надана у рамках спільних досліджень з МТС Каролінського Інституту (м. Стокгольм, Швеція).

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

2.3. Культивування клітинних ліній

Всі клітинні лінії культивували в середовищі RPMI з додаванням 2 мМ /л глютаміну, 100 одиниць пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 10% (об/об) ембріональної бичачої сироватки (повне середовище) при температурі 37°C в середовищі з 5% вмістом CO_2 . Промивали клітини двічі стерильним натрій-фосфатним буфером – 1 мл на 25 cm^2 площі флакона. До клітин, що використовували для виділення тотальної РНК або ДНК додавали лізуючі розчини. Клітини для подальшого культивування знімали за допомогою трипсину-ЕДТА: додавали 0,1-0,25% трипсину з ЕДТА в натрій-фосфатному буфері. 2-5 хвилин інкубували при 37°C , інтенсивно струшували культуральний

флакони. Після відкріплення клітин додавали середовище з сироваткою для інактивації трипсину. Потім переносили клітини до центрифужної пробірки та центрифугували 5 хв. при 300 g. Повністю відбирали супернатант. Ресуспендували клітини у повному середовищі RPMI. Відбирали аліквоти для підрахунку клітин. Та висівали клітини для подальших експериментів.

2.4. Виділення геномної ДНК з тканин

Для виділення ДНК використовували GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit “Thermo Scientific” згідно протоколу виробника. Зразки пухлин і умовно-нормальних тканин вагою 25-30 мг гомогенізували в рідкому азоті у фарфоровій ступці. Отриманий матеріал поміщали в 1,5 мл пробірки і ресуспендували в 180 мкл розчину для розчинення зразків (Digestion Solution). Потім додавали 5-7 мкл розчину протеїнази К (20 нг/мкл) і перемішували суміш на вортексі до отримання однорідної суспензії. Інкубацію проводили при 56°C протягом ночі.

Зразки обробляли 20 мкл розчину А з РНКазою (A Solution with RNase), перемішували і інкубували протягом 10хв. Після перемішування додавали 200 мкл лікуючий розчин (Lysis Solution), перемішували на вортексі до отримання однорідної суміші. Додавали 400 мкл 50% етанолу і ретельно перемішували. Отриманий лізат переносили до колонки GeneJET™ Genomic DNA Purification із пробіркою для збору рідини. Колонку центрифугували протягом 1 хв при 6000 g, переносили в нову пробірку для збору рідини і додавали 500 мкл промивного буферу 1 (Wash Buffer I), змішаного з етанолом. Центрифугували при 8000 g. протягом 1 хв. Після цього колонку вставляли знову у пробірку для збору рідини. На колонку додавали 500 мкл промивного буферу 2 (Wash Buffer II) (з етанолом), центрифугували 3 хв на максимальній швидкості (12000 g). При наявності залишку рідини в колонці процедуру центрифугування повторювали, після чого колонки переносили в стерильні 1,5 мл пробірки і додавали 200 мкл Елююючого буферу (Elution Buffer) нагрітого до 55°C у

центральну частину колонки. Інкубували протягом 2 хв при 55°C, потім центрифугували 2 хв на 8000 g. Отримані зразки зберігали при -20°C.

2.5. NotI-мікропанелі

2.5.1. Приготування проб геномної ДНК. На першому етапі підготовки ДНК проб проводили їхню обробку рестриктазою *NotI*. Для цього брали 3мкг геномної ДНК, 10x буфер 3 (NEB), 100xBSA (NEB) (10мг/мл), 10 од. *NotI* (NEB), доводили об'єм dH₂O до 40 мкл. Інкубували при 37°C протягом 4 годин, зупиняли реакцію рідким азотом і нагріванням до 65°C 3 рази. Контроль продукту здійснювали в 0,8% агарозному гелі.

Після цього проби лігували з *NotI*-лінкером. Для лігування брали 39 мкл розчину ДНК після обробки *NotI*, 10x лігуючий буфер (NEB), 0,5 мкл *NotI*-anti-link, 5 од. лігази (NEB), доводили dH₂O до 110 мкл, інкубували при 4°C упродовж ночі. Далі готували *NotI*-anti-link проби. Для цього брали 10 мкл *NotAntBio**, 10 мкл *NotAntComp**, 10x буфер (Roshe), доводили буфером 1x TE до 100 мкл, нагрівали на водяній бані впродовж 2 хв., охолоджували. Брали 5 мкл приготованого розчину, 10x кіназний буфер (NEB), 10 од. кінази T4, доводили буфером 1x TE до 100 мкл, інкубували при 37°C упродовж 30 хв.

* Олігонуклеотиди:

NotAntBio 5'-Biotin-cagcactgacccttttgggaccgc-3' 24bp

NotAntComp 5'-ggccgcggtcccaaaagggtcagtgctg-3' 28bp

Далі проби осаджували з ПЕГ. Для цього брали 110 мкл розчину ДНК після лігування з *NotI*-лінкером, 33 мкл 5M NaCl, 71,5 мкл 20% PEG 8000. Суміш охолоджували 1 годину на льоду, центрифугували 20 хв. на 8000 g при 4°C, осад розчинили в 30мкл1xTE. Контроль продукту здійснювали в 0,8% агарозному гелі (брали 1 мкл осаду і 10 мкл супернатанту).

На наступному етапі здійснювали обробку рестриктазою *Sau3AI*. Для цього брали 29 мкл ДНК після осаджування з PEG, 10x буфер *Sau3A* (NEB), 20 од. *Sau3AI* (NEB), доводили dH₂O до 40 мкл, інкубували при 37°C протягом 3

годин. Отримані проби іммобілізували на кульках Dynabeads M-280 Streptavidin “DynaL”. Для цього 5 мкл кульок відмивали 3 рази в 2xV&W буфері (10мМоль Tris-HCl (pH 7,5), 1мМоль EDTA, 2М NaCl) і розчинили в 50 мкл 2xV&W буфера. Потім додали до цих кульок в 2xV&W буфері 40 мкл ДНК, обробленої *Sau3AI*. Проби крутили на ролері протягом 20-и хв., потім ставили на 2 хв. на магніт. Додавали 50 мкл 2xV&W буферу і ресуспендували за допомогою мірної піпетки. Ставили знову на 2 хв. на магніт, видаляли супернатант. Відмивали кульки 3 рази в 2x V&W буфері. Потім промивали кульки двічі в 50 мкл 1x V&W буфері і 3 рази в TE буфері. Розчиняли кульки в 20мкл 1xTE.

Наступний крок - приготування *SauZgt99link*. Для цього брали 10 мкл *SauZgtBlock**, 10 мкл *SauZgtComp**, 10x буфер (Roshe), доводили буфером 1x TE до 100 мкл, нагрівали на водяній бані протягом 2 хв., охолоджували на воді. Брали 20 мкл приготованого розчину, 10x кіназний буфер (NEB), 10 од. кінازی (NEB), доводили до 100 мкл буфером 1x TE, інкубували при 37°C упродовж 10 хвилин.

* Олігонуклеотиди:

SauZgtBlock 5'-gatcctcaaacgcgt-block-3'

SauZgtComp 5'-ggcgatctatcctagagcccgtacgcgtttgag-3'

Отриманий продукт лігували з *Sau3AI*-лінкером. Для лігування брали 20 мкл ДНК на кульках з попереднього етапу, 10x буфер для лігування (NEB), 0,5 мкл *SauZgt99link*, 5 од. лігази (NEB), доводили dH₂O до 50 мкл, інкубувати при 4°C протягом ночі. Потім промили 3 рази в 50 мкл буфера TE, з використанням магніту. Осад розчиняли в 50 мкл TE.

Далі проводили напрацювання продукту ПЛР (ампліфікація ДНК). Брали 1 мкл ДНК з попереднього кроку разом з кульками, 5x ПЛР буфер#9, 200 мкМ dNTP, 1 мкл Primer anti-univ* (20μM), 1 мкл Primer Zgt99* (20μM), 1 од. (1 мкл) Taq-полімерази (NEB), доводили dH₂O до 30 мкл. Контроль продукту здійснювали в 0.8% агарозном гелі (наносили 3μl продукту ПЛР).

Умови ПЛР: Ампліфікацію ДНК (35 циклів) здійснювали на приладі Percin-Elmer 2720 (95°C-45 сек., 64°C-40 сек., 72°C-2хв. 20 сек.) з ініціацією

денатурації при 95°C упродовж 2 хв. Фінальну елонгацію проводили при 72°C впродовж 4 хв.

*Праймери: Anti-univ 5'-cagcactgacccttttgggacc-3' 22bp

Zgt99 5'-ggcgatctatcctagagccccgt-3' 22bp

Отриманий ПЛР продукт осаджували за допомогою солі та спирту. Для цього брали 27 мкл продукту ПЛР, 2,7 мкл 5М NaCl, 81 мкл 99 % етанолу, тримали 15 хв при -80°C, центрифугували 20 хв. При 8000 g, видаляли супернатант; додавали 150 мкл 70% EtOH, центрифугували 20 хв при 8000 g, осад розчиняли в 50 мкл буфера 1xTE.

Після цього проводили мічення ДНК флуоресцентними барвниками за допомогою ПЛР. Усі наступні етапи проводили без доступу світла. Брали 3мкл (200-400нг) ДНК, 5xПЛР буфер#9, 200 мкМ dNTP (усі, крім dCTP), 80 мкМ dCTP, 1,2 мкл (1,25 нМ) dCTP Cy3 (або 1,5 мкл (1,5 нМ) dCTP Cy5), 1 мкл праймера anti-univ* (20 мМ), 1 мкл праймера Zgt99* (20 мМ), 1 од. (1 мкл) Taq-полімерази (NEB), доводили dH₂O до 30 мкл.

Умови ПЛР: Ампліфікацію ДНК (35 циклів) здійснювали на приладі Рerkin-Elmer 2720 (95 С-45 с, 60 С-40 с, 72 С-2 хв 20 с) з ініціацією денатурації при 95 С протягом 2 хв. Фінальну елонгацію проводили при 72 С протягом 4 хв. Для ДНК з нормальних тканин використовували флуоресцентний барвник Cy3 (зелений), а для ДНК з пухлин – Cy5 (червоний), Amersham.

Після проведення ПЛР продукт переосаджували. Для цього брали 30 мкл продукту ПЛР, 3 мкл 5М NaCl, 90 мкл 99% етанолу, витримували 1 годину при -80°C, 20 хв центрифугували при 8000 g, видаляли супернатант. Додавали 150 мкл 70% етанолу, інкубували 20 хв при кімнатній температурі, 20 хв центрифугували при 8000 g, сушили близько 1 хв; осад розчиняли в 20мкл dH₂O (зразки готові для гібридизації).

2.5.2. Гібридизація та сканування NotI-мікропанелей. Безпосередньо перед гібридизацією об'єднували проби, які були приготовані з ДНК пухлин та нормальних тканин, по 50 мкл. Додавали 100 мкл 2,5x гібридизаційного буфера (5x SSC, 5x розчин Денхарта, 1 мМ пірофосфат Na, 50 мМ Тріс, рН 7,5) та 100

мкл формаміду. Інкубували при 95°C протягом 5 хв, охолоджували суміш 1 хв. на льоду, додавали 2,5 мкл 10% SDS. Суміш проб вносили у гібридизаційну камеру.

Гібридизацію NotI-мікропанелей з міченими пробами проводили на приладі TECAN100 і сканували на приладі GenPix400. Обрахунок результатів проводили за допомогою програми GenPix4.0.

Значення відносної гібридизації оцінювали за співвідношенням інтенсивності флуоресценції Cy5 і Cy3. Якщо відношення Cy5/Cy3 у межах 0-0,34 - детектовано гомозиготну делецію та/або метилювання, у інтервалі від 0,35 до 0,84 – знайдено гетерозиготну делецію та/або метилювання. Якщо відношення сигналів у межах 0,85-1,50 – вважали, що змін не виявлено, та якщо відношення більше, ніж 1,51 - детектовано ампліфікацію та/або деметилювання.

2.6. Визначення статусу метилювання геномної ДНК

2.6.1. Бісульфітна обробка ДНК. Для бісульфітної модифікації використовували EZ DNA Methylation™ Kit (ZYMO RESEARCH) згідно протоколу виробника. До 500 нг геномної ДНК пухлин і умовно-нормальних тканин додавали 5 мкл M-Dilution Buffer і доводили об'єм до 50 мкл водою. Перемішаний зразок інкубували протягом 15 хв при 37°C. Потім до кожного зразка додавали 100 мкл підготовленого CT Conversion Reagent і перемішували. Зразки інкубували у темряві, при 50°C протягом 15 годин (на ніч).

Після інкубації зразки переносили на лід на 10 хв. Далі додавали 400 мкл M-Binding Buffer до колонки Zymo-Spin™ IC Columni, ставили колонку в пробірку для збору рідини, після чого наносили зразок на колонку і перемішували. Центрифугували при максимальних обертах (>10,000 g) протягом 30 с. До колонки додавали 100 мкл M-Wash Buffer і знову центрифугували при тих же умовах. Далі в колонку додавали 200 мкл M-Desulphonation Buffer і залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв. Після інкубації центрифугували 30 с. на повній швидкості. Потім до колонки

додавали 200 мкл M-Wash Buffer. Центрифугували за тих же умов і додавали повторно 200 мкл M-Wash Buffer, після чого центрифугували 30 с. при максимальних обертах. Далі колонки переносили до стерильних 1,5мл пробірок, вносили 10 мкл M-Elution Buffer, прямо в центр матриксу колонки. Центрифугували при максимальній швидкості 30 с. для елюції ДНК. Отримані зразки зберігали при -20°C для подальшого використання.

2.6.2. Метилспецифічна ПЛР. Модифікована ДНК (100 нг) була використана в якості матриці для ПЛР з праймерами, які були підібрані за допомогою онлайн-інструменту MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). ПЛР проводилась у 1x ПЛР буфері (Thermo Scientific) з 0,2 мМоль dNTPs, 0,3 мкМоль праймерами, 100 нг модифікованої ДНК і 1,5U DreamTaq-полімерази (Thermo Scientific). Ампліфікація (35 циклів) здійснювалась на приладі BIS Termocycler 30 с. при 95°C , 30 с. при 60°C і 30 с. при 72°C з ініціацією денатурації при 95°C впродовж 4 хв. Фінальна елонгація при 72°C проводилась впродовж 5 хв. Електрофоретичний аналіз зразків ДНК після ПЛР проводився у 2% агарозному гелі в 1xTAE або 0,5xTBE.

2.6.3 Бісульфитне секвенування.

2.6.3.1 ПЛР для ампліфікації фрагментів ДНК перед секвенуванням.

Ампліфікація проводилася методом ПЛР з використанням полімерази DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, США). Для цього брали 5 мкл 10x буферу DreamTaq Buffer, 5 мкл суміші 0,2 мМ дНТФ, 100 нг бісульфитно обробленої ДНК, 0,3 мкл прямого та зворотного праймерів (0,2 мкМ), 1,25 одиниць полімерази Dream Taq DNA polymerase та доводили водою, вільною від нуклеаз до 50 мкл. Перемішували та ставили в ампліфікатор Perkin-Elmer 2720 (Perkin-Elmer, США).

Ампліфікацію проводили за наступних умов: ініціація денатурації - 95°C протягом 2 хв., денатурація - 95°C , 30 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 30 сек. Фінальну елонгацію проводили при 72°C протягом 4 хв.

Отриманий ПЛР продукт використовували для лігування та клонування.

2.6.3.2 Лігування продуктів ПЛР. Для лігування використовували набір реагентів InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США). Для лігування фрагментів у вектор pTZ57 R/T готували реакційну суміш, яка містила 3 мкл розчину вектора pTZ57 R/T (0,17 пкМ), 6 мкл 5x лігуючого буфера, 80-90 нг ПЛР продукта, 1 мкл T4 DNA Ligase. Об'єм суміші доводили водою, вільною від нуклеаз до 30 мкл. Отриману суміш інкубували 1 годину за температури 22°C. Для трансформації клітин використовували 2,5 мкл реакційної суміші.

2.6.3.3 Трансформація компетентних клітин *E. coli* штам JM107. Отримання компетентних клітин проводили з використанням набору TransformAid Bacterial Transformation kit (Thermo Scientific, США) у клітинах штам JM107 (Thermo Scientific, США). За добу перед трансформацією пересівали одну колонію *Escherichia coli* в 2 мл розчину C-medium та інкубували в термостаті з функцією перемішування Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Латвія) (160-180 об/хв.) 12-14 годин за температури 37°C. Наступного дня 150 мкл нічної культури переносили до 1,5 мл попередньо нагрітого розчину C-medium та інкубували в термостаті з перемішуванням (160-180 об/хв.) 20 хв. за температури 37°C. Потім клітини осаджували методом центрифугування при 10000 g протягом 1 хв., виливали супернатант та ресуспендували осад клітин в 300 мкл розчину T-solution та інкубували на льоді 5 хв. Після цього клітини знов осаджували методом центрифугування при 10000 g протягом 1 хв., виливали супернатант та ресуспендували осад клітин в 120 мкл розчину T-solution та інкубували на льоді 5 хв. Для трансформації до клітин в кількості 50 мкл додавали 4 мкл вектора після реакції лігування та витримували на льоді 5 хв., після чого висівали на попередньо прогріте агаризоване середовище з ампіциліном та тетрацикліном і інкубували за температури 37°C 12-14 годин.

2.6.3.4 Культивування бактерій *E.coli*. Для синьо-білого скринінгу трансформованих клітин, що містять цільову конструкцію, трансформовані клітини *E.coli* штам JM107 культивували на агаризованому середовищі, яке містило 1,5 % агару в LB Broth (20г/л) (Sigma-Aldrich, США), 0,1 мМ ізопропіл-

β -D-1-тіогалактопіранозид, 20 мкг/мл X-Gal (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл- β -D-галактопіранозид), 100 мкг/мл ампіциліну та 10 мкг/мл тетрацикліну. Клітини інкубували 18 годин за температури 37°C, потім відбирали поодинокі білі колонії та переносили у пробірки з рідким живильним середовищем LB Broth (20г/л) (Sigma-Aldrich, США), яке містило 100 мкг/мл ампіциліну та 10 мкг/мл тетрацикліну. Культивували клітини 18 годин за температури 37°C у термостаті з перемішуванням Environmental Shaker- Incubator ES-20 (Biosan, Латвія) (160-180 об/хв.).

2.6.3.5. Виділення плазмідної ДНК. Виділення плазмідної ДНК проводили за допомогою набору GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) згідно протоколу виробника. Виділені препарати плазмідної ДНК секвенували на автоматичному секвенаторі.

2.6.3.6. Секвенування ДНК. Клоновані ПЛР продукти були секвеновані на автоматичному секвенаторі ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) у використанні набору для секвенування Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) та прямого праймера до ПЛР продукта згідно з інструкцією виробника. Послідовність ДНК аналізували за допомогою програмного забезпечення Sequencing Analysis (Applied Biosystems, США) та Chromas 1.55 (Technelysium LTD, Австрія). Аналіз нуклеотидних послідовностей виконували з використанням сервіса BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.7. Аналіз генетичних змін генів: кількості копій досліджуваних генів та втрати гетерозиготності (LOH)

Аналіз кількості копій гена виконували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі на приладі Bio-Rad iQ5. Праймери були підібрані за допомогою онлайн-ресурсу Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2* в якості референсного гена використовували *TBP*. Для генів *GPX1*, 3, 4 використовували референсний ген *COL2A1* (додаток Б). Реакції

виконували використовуючи реактиви фірми «Thermo Scientific» SYBR Green PCR Master Mix. Кожна проба містила 20 мкл реакційної суміші. Концентрація прямого і зворотнього праймерів складала 400 нМоль, концентрація кДНК складала 10 нг/мкл. Реакції виконували за програмою: денатурація 10 хв при 95°C, потім 35 циклів за такою схемою: денатурація 95°C 20 сек, відпал праймерів 60°C протягом 20 сек і елонгація 72°C 40 сек. Кожний зразок аналізували у триплетах. Згідно з гістологічним аналізом, вміст у пухлинному зразку елементів строми і лімфоцитів може досягати 30–40%. Отже, якщо розраховане відношення числа копій гена у пухлині відносно до нормальної тканини нижче 0,35 - вважали, як гомозиготну делецію. Як гемізиготну делецію визначали, якщо зразки мали значення у діапазоні 0,35-0,85. Алель вважали ампліфікованим, якщо значення було вище 1,5 [185]. Зразки, що мали значення в діапазоні 0,85-1,5 - не мали змін кількості копій гена.

Вивчення втрати гетерозиготності проводили за допомогою денатуруючого ПААГ електрофорезу продуктів ПЛР з міченими Су5 праймерами (ІВА, США) для генів *GPX1* та *GPX3* (додаток Б).

Електрофорез проводили на автоматичному лазерному секвенаторі «ALF express» («Pharmacia Biotech», США). Суміш, що містила 3 мкл продукту ампліфікації і 2 мл буфера для нанесення (0,01% бромфенолового синього, 0,01% ксилол ціанолу, 98% формаміду), денатурували при 95 ° С протягом 5 хв перед електрофорезом.

2.8. Виділення тотальної РНК

Тотальну РНК з тканин виділяли за допомогою TRI Reagent (Sigma-Aldrich, США). Спочатку, 160-180 мг тканини розтирали в рідкому азоті. Після цього додавали 2 мл розчину TRI Reagent та проводили обробку ультразвуком на приладі Ultrasonic Homogeniser 4710 Series (Cole-Parmer, США) 3 рази по 15 с з перервами по 10 с з амплітудою 70 мкм. Потім інкубували зразки 10 хв за кімнатної температури для повного лізису тканин. Після інкубування з

лізуючим розчином TRIReagent до зразків додавали хлороформ у співвідношенні 1:5 до лізуючого розчину. Після цього проводили інкубування за температури 4°C впродовж 10 хвилин. Зразки центрифугували 15 хв при 12000 g за температури 4°C. Водну фазу переносили в нову центрифужну пробірку та додавали 700 мкл ізопропілового спирту на 1 мл розчину TRI Reagent. Зразки витримували 10 хв за температури -20°C. Потім проводили їх центрифугування 10 хв при 12000 g за температури 4°C. Отримані осаді РНК промивали розчином 75% етанолу. На 1 мл лізуючого розчину додавали 1 мл спирту та центрифугували 5 хв при 7500 g за температури 4°C. Підсушували осаді РНК за кімнатної температури та розчиняли їх у воді вільній від нуклеаз (50-70 мкл). Зберігаються отримані зразки РНК за температури -80°C. Якість отриманої РНК перевіряли електрофорезом за протоколом, поданим нижче.

Тотальну РНК виділяли з клітинних ліній для різних експериментів з використанням декількох наборів реагентів. Зокрема, для подальшого дослідження за допомогою власного експресійного мікрочипу тотальну РНК з клітин виділяли за допомогою набору Rneasy Mini kit (Qiagen, Германія). Спочатку до клітин (кількістю до 1×10^7) додавали 350 мкл лізуючого буферу RLT. Перемішували на струшувачі VortexGenie 2 (ScientificIndustries, США) та переносили в спеціальні центрифужні колонки (QIAshredder, Qiagen, Германія), які розміщені в пробірках. Перемішували піпетуванням та центрифугували 2 хв при 16000 g. Після цього додавали 350 мкл 70% етанолу, перемішували піпетуванням. Потім переносили 700 мкл зразка в інші центрифужні колонки (RNeasy spin column), які розміщені в пробірках, та центрифугували 15 с при 8000 g. Виливали фільтрат та додавали 700 мкл буферу RW1 і знов центрифугували 15 с при 8000 g. Виливали фільтрат та додавали 500 мкл буферу RPE. Центрифугували 15 с при 8000 g. Потім знов додавали 500 мкл буферу RPE та центрифугували 2 хв при 8000 g. Потім переносили колонку в нову пробірку, додавали 30-50 мкл води, вільної від нуклеаз, та центрифугували 1 хв при 8000 g.

Для дослідження клітинних ліній за допомогою комерційного експресійного мікрочипу РНК виділяли за допомогою набору RNAqueous Micro Kit (Applied Biosystems, США). До клітин в кількості приблизно 5×10^5 додавали 100 мкл лізуючого розчину та перемішували на струшувачі Vortex Genie 2. Потім додавали 50 мкл 100% етанолу на 100 мкл лізуючого розчину та перемішували на струшувачі Vortex Genie 2. Отриману суспензію поміщали в мікрофільтровальну касету та центрифугували 10 с при 16000 g. Після цього додавали до касети 180 мкл буфера 1 для промивки і центрифугували 10 с при 16000 g. Потім двічі додавали до касети 180 мкл буфера 2/3 для промивки і центрифугували 10 с при 16000 g. Виливали фільтрат та центрифугували 1 хв при 16000 g. Переносили фільтрувальну касету до нової пробірки та двічі додавали 10 мкл підігрітого до 75°C розчину для елюції. Потім витримували 1 хв за кімнатної температури та центрифугували 30 с при 16000 g. Якість отриманої РНК перевіряли електрофорезом за протоколом, поданим нижче.

2.9. Електрофорез РНК в агарозному гелі

Якість виділених зразків тотальної РНК перевіряли електрофорезом в денатуруючих умовах. Готували 50 мл 1% розчину агарози з 0,5 г агарози, 2,5 мл 20х боратного буферу, 43,5 мл DEPC- H_2O , 4 мл формальдегіду. Зразки тотальної РНК готували наступним чином: змішували 1 мкг РНК, 5 мкл 2х RNA Loading Dye (ThermoScientific, США) та доводили загальний об'єм зразка до 10 мкл водою, вільною від нуклеаз. Зразки інкубували 10 хв при 65°C , охолоджували та вносили в гель. Електрофорез проводили в 1х боратному буфері 1-1,5 години при напрузі 60-70 В.

2.10. Синтез першого ланцюга кДНК

Всі отримані зразки РНК були оброблені ДНКазою I (Thermo Scientific, США) перед синтезом кДНК. Для цього відбирали 1-2 мкг РНК, додавали 1 мкл

10x реакційного буферу з $MgCl_2$, 1 мкл ДНКазу I та доводили водою, вільною від нуклеаз до 10 мкл. Інкубували 30 хв при $37^\circ C$. Потім додавали 1 мкл 50 мМ розчину ЕДТА та інкубували 10 хв за температури $65^\circ C$. Отриману РНК використовували для подальшого синтезу кДНК, використовуючи набір First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoScientific, США) та суміш оліго(dT)- та Random праймерів відповідно до протоколу виробника. Спочатку відповідну кількість РНК змішували з 1 мкл оліго(dT)-праймерів та доводили водою, вільною від нуклеаз, до 12 мкл та витримували 5 хв за температури $65^\circ C$. Потім охолоджували та додавали 4 мкл 5x реакційного буферу, 1 мкл інгібітору РНКаз RiboLock (20 одиниць/мкл), 2 мкл 10мМ розчину dNTP, 1 мкл зворотної транскриптази Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 одиниць/мкл). Загальний об'єм становив 20 мкл. Розчин перемішували та центрифугували, після цього інкубували 1,5 години за температури $42^\circ C$. Переривали реакцію інкубуванням 5 хв за температури $70^\circ C$. Отриману кДНК використовували в подальших експериментах. Короткотривале зберігання проходило при $-20^\circ C$. Довготривале зберігання здійснювали при $-70^\circ C$.

2.11. Кількісна ПЛР для визначення рівнів відносної експресії генів

ПЛР у реальному часі (кПЛР) проводили на ампліфікаторах iCycler iQ5 Multicolor Detection System (Bio-Rad, США) та CFX96 (Bio-Rad, США) з SYBR Green PCR Master Mix (ThermoScientific, США) та Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (ThermoScientific, США) згідно протоколу виробника з модифікаціями під певні пари праймерів за 2 та 3-кроковою програмою. Умови проведення кПЛР реакцій: $95^\circ C$ - 10 хв, наступні 40 циклів: $95^\circ C$ – 15 с, $60^\circ C$ - 20 с, $72^\circ C$ – 30 с. Праймери до досліджуваних генів були підібрані з бази даних праймерів для кількісної ПЛР: <http://primerdepot.nci.nih.gov/> та перевірені за допомогою <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> algorithm. Праймери для кПЛР наведені у додатках В-Г. Рівні відносної експресії (ВЕ) нормалізували за референсними генами *GAPDH*, *ACTB*, *TBP*, *HPRT*, *ALAS1* та *TUBA1B* згідно

умов експерименту [227]. Рівні ВЕ генів розраховували методами $2^{-\Delta Ct}$ та $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [228].

2.12. Клітинні тести та досліді на тваринах

2.12.1. Трансфекція і виділення стабільно трансфікованих клітинних клонів SEMA3B-U2020. кДНК, що кодує ген SEMA3B, клонували в епісомальний тетрациклін-регульований вектор, рЕТЕ. Для отримання стабільних клонів U2020 клітин, що експресують SEMA3B, проводили трансфекцію рЕТЕ / SEMA3B плазмідною ДНК або порожнім вектором рЕТЕ для контролю (0,5 мг ДНК на лунку) в 12-лункових планшетах з використанням Lipofectamine і Plus Reagent (Invitrogen, CA, США) відповідно до протоколу виробника. Клітини рЕТЕ / SEMA3B-U2020 і рЕТЕ-U2020 культивували протягом 2-3 тижнів в середовищі IMDM, що містить Bsd (5 мкг / мл) для селекції стабільних клонів. Експресія SEMA3B регулювалася доксицикліном.

2.12.2. Тест на формування колоній. Трансфіковані клітини U2020 (з рЕТЕ і рЕТЕ / SEMA3B) знімали через 24–48 год після трансфекції і пересівали у культуральні чашки 100мм² при щільності 500-1000 клітин на чашку. Після відбору з Bsd (5 мкг / мл), проводили забарвлення колоній за Гімза та фотографували і підраховували за допомогою програмного забезпечення QuantityOne (версія 4.4.0; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Життєздатність клітин оцінювали за допомогою аналізу FACS з пропідієм йодидом (PI-FACS), дотримуючись рекомендацій виробника (FACS Calibur, BD Bioscience).

2.12.3. Дослідження пухлино-супресорної активності гена SEMA3B *in vivo*. Здатність визивати пухлини або навпаки супресорну активність трансфікованого рЕТЕ / SEMA3B та порожніх U2020 клітин й клітин трансфікованих рЕТЕ (контроль), оцінювали шляхом їх підшкірного введення 6–8-тижневим імунодефіцитним мишам (SCID миші). Клітини збирали центрифугуванням на 800 об / хв протягом 2 хв і ресуспендували в безсивороточному середовищі IMDM при концентрації $2-3 \times 10^6$ клітин на 100

мкл ін'єкції. Клітини вводили в матрицю Матрігеля (BD Biosciences, Erembodegem, Бельгія) згідно з протоколом виробника. Мишей спостерігали на наявність утворення пухлин двічі на тиждень. Розмір пухлин вимірювали за допомогою штангенциркуля.

2.12.4. Імуногістохімічний аналіз пухлинної клітинної лінії U2020 і ангиогенезу пухлин імунодефіцитних мишей. Як вже описано, плазмиду рЕТЕ / SEMA3В вводили клітинну лінію U2020, яка конститутивно продукувала тетрацикліновий трансактиватор (ТТА). Мишам давали питну воду з доксицикліном (+дох, ген не експресувався (OFF) або без доксицикліну (-дох, ген експресувався (ON). Мишей піддавали евтаназії через 1 місяць. Пухлини або місця ін'єкцій клітин вирізали, фіксували у нейтральному формаліні та заливали у парафін. Блоки нарізали товщиною 5 мм та переносили на предметні скельця. Далі парафін розчиняли в ксилолі (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), і зрізи тканин обробляли послідовно 99, 95, 75 і 30% етанолом. Епітопи активували нагріванням в мікрохвильовій печі протягом 5 хв у цитратному буфері. Анти-CD31 мишаче антитіло, разом з кролячо-анти-мишачим FITC-кон'югованим вторинним антитілом (Dako, Karlstrup, Denmark), використовували для забарвлення мікросудин. Аналіз TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Boehringer Mannheim, Німеччина) використовували для виявлення апоптозу, згідно протоколу виробника.

2.13. Імуногістохімічний аналіз експресії білків у тканинах пухлин

Свіжі тканини передміхурової залози фіксували в нейтральному забуференому 4% розчині формальдегіду. Після фіксації, дегідратації тканини заливали у парафін. Серійні зрізи тканин нарізали товщиною 5 мкм і фарбували гематоксилином / еозином для гістологічної діагностики.

Експресію білків TGFB1, PLAУ, FOS, IL1b та TAGLN оцінювали, використовуючи специфічні антитіла за допомогою імуногістохімії. Після нагрівання при 56°C парафін розчиняли в ксилолі, і зрізи тканин регідратували

поетапним промиванням етанолом у фосфатно-сольовому буферному розчині (PBS) зменшуючи концентрацію етанолу: 99%, 90%, 70% і 30% етанолу. Потім тканини обробляли 2% розчином перекису водню в метанолі при кімнатній температурі протягом 30 хв, щоб зменшити фонове фарбування. Епітопи експонували в гарячому цитратному буфері на водяній бані 92 ° C протягом 15 хв. Антитіла розводили (1: 100 мишачих антитіл і 1: 100 кролячих антитіл) в блокуючому буфері (2% бичачого сироваткового альбуміну, 0,2% Tween-20, 10% гліцерину і 0,05% NaN₃ в PBS). Сигнали білка були візуалізовані за допомогою системи виявлення пероксидази / DAB системи EnVision™ (Dako, Glostrup, Denmark). Ядра фарбували гематоксилином Майєра (Dako).

2.14. Статистична обробка даних

Значущі генетичні та/або епігенетичні зміни генів та/або локусів за даними NotI- мікропанелей встановлювали за допомогою відкритого ресурсу Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (<http://www.openepi.com/>) та програми NIMAN, створеної співавторами [29, 30].

Аналіз результатів досліджень відносної експресії, метилювання, аналіз копій генів проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA10. Для оцінки нормальності розподілу значень відносних рівнів експресії генів використовували тести Колмогорова-Смірнова та Ліллієфорса. Парний тест Вілкоксона використовували для оцінки відмінностей між аденокарциномами та парними їм умовно-нормальними тканинами за моделлю $2^{-\Delta Ct}$. Точний тест Фішера був застосований для виявлення змін між парами груп за моделлю $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Процедура Бенжаміні-Хохбера з FDR = 0,1-0,25 використано для корекції на множинні порівняння для цих тестів [546]. Тести Краскела-Уолліса та Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виконували для встановлення відмінностей відносної експресії між всіма досліджуваними групами зразків.

Таблиці спряженості використовували для оцінки взаємозв'язків між рівнями відносної експресії генів між групами аденокарцином, ДГПЗ та умовно-нормальних тканин, аденокарцином із різною сумою за шкалою Глісона (СГ) та рівнями ПСА у сироватці крові пацієнтів із аденокарциномами. Аналіз рівнів значущості зв'язків проводили за допомогою точного тесту Фішера. Логістичну регресію використовували для аналізу асоціацій між рівнями відносної експресії генів та клініко-патологічними показниками. Точний тест Фішера та критерій χ^2 використовували для аналізу частот метилювання/делецій у групах пухлин передміхурової залози із різними патоморфологічними характеристиками. Значення $p < 0,05$ вважалися статистично значущими для всіх видів аналізу.

Тест рангової кореляції за Спірменом застосовували для пошуку кореляцій між експресією досліджуваних генів та клініко-патологічними характеристиками зразків й кореляцій ВЕ між генами. Методи класифікації (дискримінантне одноваріантне розділення для категоріальних та порядкових предикторів, регресійні моделі дерев (C&RT)) та кластеризації за К-значеннями були використані для пошуку класифікаторів та молекулярних підтипів пухлин передміхурової залози. Програма MDR 3.0.2 (<http://epistasis.org/software.html>) застосована для розробки експресійних наборів та аналізу їх статистичних параметрів та діагностичного рівня [547, 548].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Виявлення генетичних та епігенетичних порушень генів 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах за допомогою NotI-мікропанелей

NotI-мікропанелі є сучасною технологією широкомасштабного скринінгу, яка дозволяє одночасно виявляти генетичні та епігенетичні [29, 549, 550]. Характер змін має дуже важливу інформацію для дослідника, що дозволить у подальшому виявити можливі механізми розвитку певної патології, але для широкомасштабного скринінгу це не є інформацією першорядного значення. Більш важливо виявити які саме гени та/або локуси мають значущі зміни при певній патології та у який бік може потенційно змінитись експресія цих генів завдяки виявленим порушенням. Загальна схема підготовки проб ДНК наведена на рис. 3.1.

NotI-мікропанелі є методом порівняльної гібридизації, для якої потрібні як дослідні зразки, у даному випадку це зразки геномної ДНК тканин пухлин (яєчника, кишечника, передміхурової залози та інші) так і зразки-контролі - це ДНК умовно-нормальних тканин (УНТ).

NotI-мікропанелі містять 180 клонів 3-ої хромосоми людини, які нанесені на скло у певному порядку. Отримані проби геномної ДНК використовували для гібридизації на NotI-мікропанелях. Зразки пухлин та УНТ мітили різними флюоресцентними барвниками (CY3 та CY5). Результати NotI-мікропанелей представляють собою співвідношення інтенсивності гібридизаційних сигналів з геномної ДНК зразків пухлин та УНТ. За цими показниками зміни генів та/або локусів групують згідно їх співвідношенням за наступними інтервалами: $\leq 0,35$ – гомозиготна делеція та/або метилювання; $0,35-0,85$ – гетерозиготна делеція

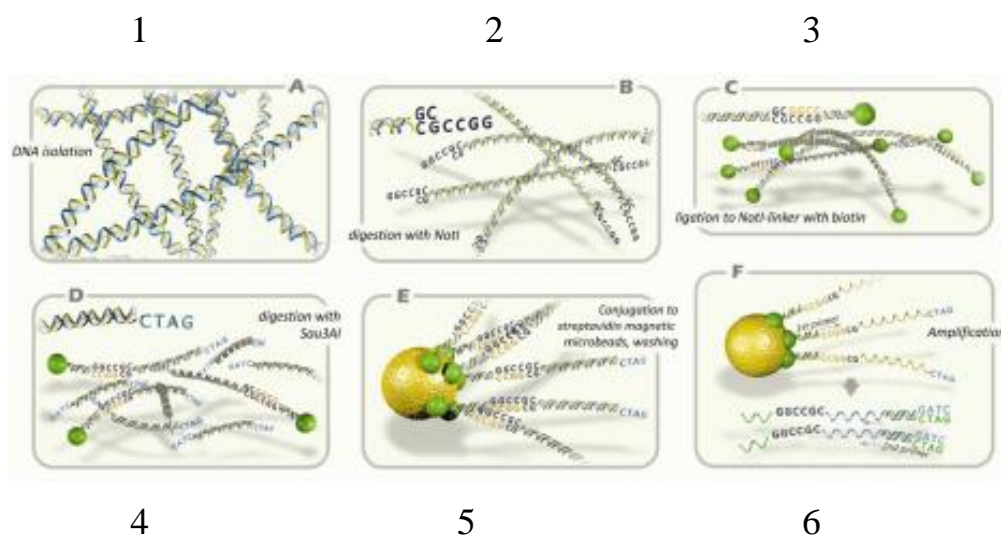


Рис. 3.1. Загальна схема підготовки проб для аналізу на NotI-мікропанелях: 1) виділення геномної ДНК; 2) обробка метил-специфічним ензимом NotI; 3) лігування фрагментів ДНК з біотинильованим NotI-лінкером; 4) обробка фрагментів рестрикційним ензимом Sau3A1; 5) зв'язування з мікрочастками зі стрептавідином; 6) специфічна ампліфікація ДНК фрагментів та/або метилювання; 0,85-1,5 – без змін; > 1,5 – ампліфікація та/або деметилювання [29, 550].

3.1.1. Результати гібридизації NotI –мікропанелей на зразках пухлин яєчника. Для дослідження генетичних та/або епігенетичних змін у генах 3-ої хромосоми людини використано 25 пухлин та УНТ яєчника. З них 18 зразків злоякісних пухлин яєчника (серозний рак яєчника) та 7 доброякісних пухлин яєчника [551, 552].

Проби геномної ДНК гібридизовано на NotI-мікропанелях зі 180 клонами 3-ої хромосоми людини. Ці клони представляли гени та/або локуси як короткого плеча 3p та були локалізовані з 3p26.2 по 3p11.1 регіон, так і довгого плеча хромосоми (3q) та були локалізовані з 3q11.2 по 3q29 регіон. Приклад профілю гібридизації зразків пухлин яєчника представлено на рис. 3.2. Найчастіші зміни, які виявлено у пухлинах яєчника – це гетерозиготні делеції та/або метилювання. Знайдено 35 генів та/або локусів, які мають значущі зміни у злоякісних пухлинах яєчника (вище 17%) (табл. 3.1).

Назва клону	1-2 стадії								3-4 стадії								Доброякісні								Ген/ локус	Локус хромосоми		
	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	
NL6 FJ5																										<i>MINT24</i>	3p25-3p26	
NR1 DH18																											<i>CACNA2D3</i>	3p21.1
NR5 GP13																											<i>LMCD1</i>	3p26-p24
NL2 001																											<i>LOC440944</i>	3p25.3
NL1 BH17																											<i>LOC442074</i>	3p25.3
NR1 WA8																											<i>IL17RE</i>	3p25.3
NL1 106																											<i>IL17RC</i>	3p25.3
NRL 404																											<i>VHL</i>	3p26-p25
NRL 98																											<i>IRAC-2</i>	3p25.3
NLM 188																											<i>SEN2L</i>	3p25.2
NR1 NK17																											<i>CAND2</i>	3p25.2
HSJ4 AB7																											<i>RPL32</i>	3p25.3
NLM 161																											<i>IQSEC1</i>	3p25.2
NR1 XM13																											<i>LOC440946</i>	3p25.2
NR1 KJ5																											<i>FBLN2</i>	3p25.1
NRL 062																											<i>NUP210</i>	3p25.2
NL4 BK12																											<i>WNT7A</i>	3p25
NLM 199																											<i>LOC131973</i>	3p25.1
NL4 DP2																											<i>SH3BP5</i>	3p24.3
NL1 177																											<i>SH3BP5</i>	3p24.3
AP1 102																											<i>EAF1</i>	3p25.1
NR1 AB20																											<i>LOC131961</i>	3p25.1
NL1 261																											<i>LOC131961</i>	3p25.1
NL4 AP18																											<i>PLCL2</i>	3p24.3
NL1 GC10																											<i>ZNF659</i>	3p24.3
NR1 WF18																											<i>UBE2E2</i>	3p24.2
NL1 CJ4																											<i>NKIRAS1</i>	3p24.2
NR1 KA8																											<i>THRB</i>	3p24.3
NL4 BB6																											<i>RARBbeta1</i>	3p24
NR1 NL9																											<i>RAB741</i>	3p24
NL3 CA11																											<i>LRRC3B</i>	3p24
NRL 082																											<i>SIMP</i>	3p24.1
NL1 024																											<i>OSBPL10</i>	3p22.3
NR5 FK11																											<i>Hs.452702</i>	3p23
NRL 063																											<i>CKLFSF6</i>	3p23
NR1 EP7																											<i>LOC440948</i>	3p23
AP 40																											<i>LOC389108</i>	3p22.3
NL1 401																											<i>ITGA9</i>	3p21.3
NL1 003																											<i>RBSP3</i>	3p21.33
AP 20																											<i>SCN5A</i>	3p21
NL3 003																											<i>GORASP1</i>	3p22-p21.33
NL1 308																											<i>MOBP</i>	3p22.2
NR1 NK20																											<i>GC20</i>	3p22.1
NR5 IB17																											<i>LOC440953</i>	3p22.1
NR1 PA6																											<i>ALI17530</i>	3p22.1
NL3 009																											<i>SNRK</i>	3p22.1
NL1 232																											<i>CGI-58</i>	3p24.3
NR1 AN24																											<i>LOC732138</i>	3p21.32
NL2 007																											<i>ZDHC3</i>	3p21.31
NL1 320																											<i>SACM1L</i>	3p21.3
NL3 010																											<i>XT3</i>	3p21.3
NLM 067																											<i>TESSP2</i>	3p21.31
NL3 006																											<i>NBEAL2</i>	3p21.31
NR1 NJ3																											<i>CSPG5</i>	3p21.3
NR1 KF21																											<i>MAP4</i>	3p21

Рис. 3.2. Приклад фрагменту профілю гібридизації NotI-мікропанелей зразків пухлин яєчника: жовті комірки – без змін; зелені зі штрихом – гетерозиготні делеції та/або метилювання, зелені – гомозиготні делеції та/або метилювання, червоні – ампліфікації та/або деметилювання

Гени та/або локуси, що зазнали найбільших змін це *IQSEC1*, *NKIRAS1/RPL15*, *THRB*, *LRRC3B*, *RBSP3* (*CTDSPL*) усі відносяться до короткого плеча (3p) 3-ої хромосоми. Але на гени 3q плеча хромосоми 3 припадає 14 з 35 генів та/або локусів зі змінами, що складає 40% від усіх генів та/або локусів з делеціями та/або метилюванням [552].

Таблиця 3.1.

**Гени та/або локуси зі значущими змінами за даними NotI-мікропанелей у
пухлинах яєчника**

№	Назва клону	Ген/локус	% дел/мет	Кількість змін	% дел/мет з неінформ	Кількість змін з неінформ
1	NR1-XM13C	<i>IQSEC1</i>	33	(6/18)	38	(6/16)
2	NL1-CJ4R (C)	<i>NKIRAS1/RPL15</i>	33	(6/18)	35	(6/17)
3	NL4-BB6R (C)	<i>THRB</i>	33	(6/18)	38	(6/16)
4	NL3-CA11RS	<i>LRRC3B</i>	33	(6/18)	35	(6/17)
5	NLJ-003RD	<i>RBSP3 (CTDSPL)</i>	33	(6/18)	33	(6/18)
6	NR1-KA8R (C)	<i>THRB</i>	28	(5/18)	56	(5/9)
7	NL1A401R (D)	<i>ITGA9</i>	28	(5/18)	29	(5/17)
8	NL3A006R (D)	<i>NBEAL2</i>	28	(5/18)	33	(5/15)
9	NL3A001R (D)	<i>GNAI2</i>	28	(5/18)	28	(5/18)
10	NL1-DE18R	<i>GATA2</i>	28	(5/18)	28	(5/18)
11	NL4-BH3R (C)	<i>GATA2</i>	28	(5/18)	28	(5/18)
12	NR1-PD1R	<i>ZIC4</i>	28	(5/18)	31	(5/16)
13	NL3003R (U)	<i>GORASP1/TTC21A</i>	22	(4/18)	24	(4/17)
14	NR1-AN24RS	<i>ABHD5/TOPAZI</i>	22	(4/18)	22	(4/18)
15	NR1-WE11RS	<i>CGGBP1</i>	22	(4/18)	24	(4/17)
16	NL3-CI2R (C)	<i>LOC285205</i>	22	(4/18)	27	(4/15)
17	NR1-WD21R (C)	<i>NEK11/NUDT16</i>	22	(4/18)	44	(4/9)
18	NR5-IO11R (C)	<i>PAQR9</i>	22	(4/18)	25	(4/16)
19	NR1-AK24R	<i>BCL6</i>	22	(4/18)	24	(4/17)
20	NL6-FJ5R (C)	<i>LRRN1</i>	17	(3/18)	17	(3/18)
21	NR1-KJ5R (C)	<i>FBLN2</i>	17	(3/18)	19	(3/16)
22	NR1-PL22R (C)	<i>LOC285375</i>	17	(3/18)	18	(3/17)
23	NL4-BK12R (C)	<i>WNT7A</i>	17	(3/18)	18	(3/17)
24	NL1308R (D)	<i>MOBP</i>	17	(3/18)	19	(3/16)
25	NR1-NC7RS	<i>PPM1M</i>	17	(3/18)	19	(3/16)
26	NR1-NJ9R (C)	<i>PRICKLE2</i>	17	(3/18)	18	(3/17)
27	NL1-BA6R	<i>FOXP1</i>	17	(3/18)	17	(3/18)
28	NL6-F020R (C)	<i>DCBLD2</i>	17	(3/18)	19	(3/16)
29	NL1-GK21R (C)	<i>ROPNI/KALRN</i>	17	(3/18)	21	(3/14)
30	NL1290R (D)	<i>CHST13</i>	17	(3/18)	17	(3/18)
31	NL2A230R	<i>ABTB1/PODXL2</i>	17	(3/18)	17	(3/18)
32	NL4-DJ11RS	<i>TRH</i>	17	(3/18)	18	(3/17)
33	NL1A079R (D)	<i>EPHB1</i>	17	(3/18)	19	(3/16)
34	NL1-FK10R (C)	<i>PPP2R3A</i>	17	(3/18)	21	(3/14)
35	NR1-NH1R (C)	<i>FGF12</i>	17	(3/18)	18	(3/17)

3.1.2. Результати гібридизації NotI –мікропанелей на зразках пухлин товстого кишечника. Для встановлення генетичних та/або епігенетичних змін 3-ої хромосоми людини при раку кишечника, нами проаналізовано 24 пари зразків геномної ДНК пухлин та УНТ. Фрагмент профілю гібридизації пухлин товстого кишечника на NotI-мікропанелях представлено на рис. 3.3.

Назва клону	1-2 стадії											3-4 стадії											Ген/локус	Локус хромосоми				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22			23	24		
NL6 FJ5																										MINT24	3p26	
NR1 DH18																											CACNA2D3	3p21.1
NR5 GP13																											LMCD1	3p26
NL2 001																											AKT28398	3p25.3
NL1 BH17																											LOC442074	3p25.3
NR1 WA8																											IL17RE	3p25.3
NL1 106																											IL17RC	3p25.3
NRL 404																											VHL	3p26
NRL 98																											IRAK-2	3p25.3
NLM 188																											SEN2L	3p25.2
NR1 NK17																											KIAA0667	3p25.2
HSJ4 AB7																											RPL32	3p25.3
NLM 161																											KIAA0763	3p25.2
NR1 XM13																											hmm57278	3p25.2
NR1 KJ5																											FBLN2	3p25.1
NRL 062																											Nucleoporin 210	3p25.2
NL1 VJ14																											Hmm61256	3p25
NR1 PL22																											Hmm61490	3p25
NL4 BK12																											WNT7A	3p25
NLM 199																											LOC131973	3p25.1
NL4 DP2																											FGD5	3p24.3
NL1 177																											SH3BP5	3p24.3
AP1 102																											EAF1	3p25.1
NR1 AB20																											ANKRD28	3p25.1
NL1 261																											ANKRD28	3p25.1
NL4 AP18																											PLCL2	3p24.3
NL1 GC10																											HMG115	3p24.3
NR1 WF18																											UBE2E2	3p24.2
NL1 CJ4																											NKIRAS1	3p24.2
NR1 KA8																											THRB	3p24.3
NL4 BB6																											RARB	3p24
NR1 NL9																											RAB7L1	3p24
NL3 CA11																											LRRC3B	3p24
NRL 082																											SIMP	3p24.1
NL1 024																											OSBPL10	3p22.3
NR5 FK11																											CMTM8	3p23
NRL 063																											CKLF5F6	3p23
NR1 EP7																											CLASP2	3p23
AP 40																											LBA1	3p22.3
NL1 401																											ITGA9	3p21.3
NLJ 003																											RBSP3	3p21.33
AP 20																											SCN5A	3p21
NL3 003																											GORASP1	3p21.33
NL1 308																											MOBP	3p22.2
NR1 NK20																											GC20	3p22.1
NR5 IB17																											HIGD1A	3p22.1
NR1 PA6																											C3orf41	3p22.1
NL3 009																											SNF-1	3p22.1
NL1 232																											CGI58	3p24.3
NR1 AN24																											hmm144092	3p21.32

Рис. 3.3. Приклад фрагменту профілю гібридизації зразків пухлин товстого кишечника на NotI-мікропанелях: жовті комірки – без змін; зелені зі штрихом – гетерозиготні делеції та/або метилювання, зелені – гомозиготні делеції та/або метилювання, червоні – ампліфікації та/або деметилювання

Всі зразки були охарактеризовані гістологічно. З них 15 зразків пухлин 1-2 стадії, 9 зразків пухлин 3-4 стадії [553]. Нами знайдено зміни у 137 зі 180 NotI-клонів 3-ої хромосоми людини. Гетерозиготні делеції та/або метилювання

були найбільш частими змінами та детектовані у 428 випадках, тоді як ампліфікації мали місце у 24 випадках та гомозиготні делеції та/або метилювання знайдено у 24 випадках теж. Серед генів та/або локусів зі змінами, нами виявлено 27 генів та/або локусів, що мають більше, ніж 30% змін у зразках пухлин кишечника (з урахуванням зразків, що мали неінформативні сигнали) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Гени та/або локуси зі значущими змінами у пухлинах товстого кишечника

Ген/локус	Локус хромосоми	% змін (дел/метилюв.)
<i>THRB</i>	3p24.3	81,8
<i>NBEAL2</i>	3p21.31	61,5
<i>LRRC3B</i>	3p24	60,0
<i>NKIRAS1</i>	3p24.2	57,9
<i>RARB</i>	3p24	56,3
<i>ITGA9</i>	3p21.3	55,0
<i>LOC152195/NUDT16P</i>	3q21.3	50,0
<i>GORASP1</i>	3p21.33	50,0
<i>UBE2E2</i>	3p24.2	47,6
<i>CKLFSF6</i>	3p23	47,6
<i>hmm57278/LOC440946</i>	3p25.2	47,4
<i>MINT24</i>	3p26	45,5
<i>hmm144092/LOC732138</i>	3p21.32	44,4
<i>VHL</i>	3p26	43,5
<i>GATA2</i>	3q21.3	42,9
<i>LOC285205</i>	3q13.12	42,9
<i>ANKRD28/LOC131961</i>	3p25.1	41,7
<i>hmm133095/LOC650370</i>	3q21.2	41,2
<i>PLCL2</i>	3p24.3	40,9
<i>LMCD1</i>	3p26	40,0
<i>PPP2R3A</i>	3q21.1	40,0
<i>FOXP1</i>	3p14.2	38,1
<i>RBSP3</i>	3p21.33	36,8
<i>ZIC4</i>	3q24	35,7
<i>p20-CGGBP</i>	3p12	35,3
<i>KY</i>	3q22.1	33,3
<i>WNT7A</i>	3p25	33,3

3.1.3. Результати гібридизації NotI–мікропанелей на зразках пухлин передміхурової залози. Для вивчення генетичних та/або епігенетичних змін хромосоми 3 людини за допомогою NotI –мікропанелей у пухлинах передміхурової залози (ПЗ) використано 33 зразки тканин передміхурової залози, з яких – 15 зразків ДНК ДГПЗ (аденом), 14 зразків ДНК аденокарцином з сумою за шкалою Глісона, яка менше чи дорівнює семи (СГ) та 4 зразки ДНК аденокарцином з сумою за шкалою Глісона більше семи [554]. Фрагмент гібридизації 48 генів та/або локусів хромосоми 3 у пухлинах передміхурової залози за даними NotI-мікропанелей наведено на рис. 3.4. Зміни більш ніж у 10% зразків знайдено у 88 генах та/або локусах зі 180. Значущі зміни вище 35-40% виявлено у 50 генах та/або локусах. Найбільш часті зміни у зразках пухлин передміхурової залози є гетерозиготні делеції та/або метилювання (1163 випадки), набагато менше виявлено гомозиготних делецій/метилювання (461 випадок) і практично відсутні ампліфікації/деметилювання (24 випадки) [554]. Гени та/або локуси, що мають найбільші відсотки змін за даними NotI – мікропанелей у пухлинах передміхурової залози представлені у табл. 3.3.

Згідно бази даних PubMed усі виявлені гени та/або локуси з високим відсотком змін можна умовно поділити на 3 групи: 1) гени та/або локуси, участь яких у канцерогенезі раніше показана не була - *HMGB1L5, LRRC58, GPR149, DZIP1L, C3orf77, NUDT16*; 2) гени та/або локуси, що приймають участь (мають зміни) у інших типах раку - *LOC285205, KY, BHLHE40, ROPNI/KALRN, BCL6, PLCL2, ITGA9, CTDSPL (RBSP3), GORASP1/TTC21A, FSTL1, ABHD5/C3orf77, IQSEC1, CLASP2, GNAI2, NEK11, FBLN2, SOX2, MINA, CHCHD6, WNT7A, LOC285375, FGF12, NKIRAS1/RPL15, CGGBP1, PPP2R3A, SOX14, ZIC4, RAP2B, RPL32/IQSEC1, RRP9/PARP3, PPM1M, KBTBD8, FGD5, CMTM8, NBEAL2, TMEM45A, LRRC3B, PDZRN3, USP19, EPHB1*; 3) гени та/або локуси, участь яких у канцерогенезі передміхурової залози добре відома - *FOXP1, GATA2, ALDH1L1, EPHB3*.

Згідно з нашими останніми результатами, деякі гени другої та третьої груп (*CTDSPL, ALDH1L1, LRRC3B, IQSEC1, FOXP1, GNAI2, EPHB1, WNT7A* та

Таблиця 3.3.

Гени з найбільшим відсотком змін у пухлинах передміхурової залози

№	Ген/локус	Локалізація	Кількість мет/дел у ЗП (n=18)	% мет/дел у ЗП	Загальна кількість мет/дел (n=33)	% мет/дел загалом	Кількість мет/дел у ЗП ≤7 (n=14)	Кількість мет/дел у ЗП >7 (n=4)	Кількість мет/дел у аденомах (n=15)
1	<i>BHLHE40</i>	3p26.1	15	83,3	29	87,9	11	4	14
2	<i>IQSEC1</i>	3p25.2	15	83,3	26	78,8	11	4	11
3	<i>BCL6</i>	3q27	15	83,3	26	78,8	11	4	11
4	<i>FOXP1</i>	3p14.1	15	83,3	25	75,8	11	4	10
5	<i>ROPNI/KALRN</i>	3q13.3	15	83,3	24	72,7	11	4	9
6	<i>PLCL2</i>	3p24.3	15	83,3	23	69,7	12	3	8
7	<i>ITGA9</i>	3p21.3	14	77,8	23	69,7	10	4	9
8	<i>ALDH1L1</i>	3q21.3	14	77,8	19	57,6	11	3	5
9	<i>GATA2</i>	3q21.3	14	77,8	17	51,5	10	4	3
10	<i>FBLN2</i>	3p25.1	13	72,2	24	72,7	9	4	11
11	<i>GORASP1/TTC21A</i>	3p22-p21.33	13	72,2	23	69,7	10	3	10
12	<i>NEK11/NUDT16</i>	3q22.1	13	72,2	22	66,7	9	4	9
13	<i>GNAI2</i>	3p21.31	13	72,2	21	63,6	9	4	8
14	<i>ZIC4</i>	3q24	13	72,2	20	60,6	9	4	7
15	<i>PPP2R3A</i>	3q22.1	13	72,2	18	54,5	9	4	5
16	<i>CLASP2</i>	3p22.3	12	66,7	24	72,7	8	4	12
17	<i>MANF</i>	3p21.1	12	66,7	24	72,7	9	3	12
18	<i>CTDSPL/RBSP3</i>	3p21.3	12	66,7	23	69,7	9	3	11
19	<i>LOC285205</i>	3q13.12	12	66,7	23	69,7	8	4	11
20	<i>FSTL1</i>	3q13.33	12	66,7	23	69,7	8	4	11
21	<i>ABHD5/C3orf77</i>	3p21	12	66,7	20	60,6	10	2	8
22	<i>MINA</i>	3q11.2	12	66,7	18	54,5	8	4	6
23	<i>SOX2</i>	3q26.3-q27	12	66,7	18	54,5	8	4	6
24	<i>LOC285375</i>	3p25.1	10	55,6	19	57,6	6	4	9
25	<i>C3orf46/CHCHD6</i>	3q21.3	10	55,6	19	57,6	7	3	9
26	<i>FGF12</i>	3q28	10	55,6	18	54,5	9	1	8
27	<i>WNT7A</i>	3p25	10	55,6	16	48,5	6	4	6
28	<i>CGGBP1</i>	3p12-p11.1	10	55,6	15	45,5	6	4	5
29	<i>RPL32/IQSEC1</i>	3p25.2	10	55,6	14	42,4	6	4	4
30	<i>USP19</i>	3p21.31	10	55,6	14	42,4	6	4	4
31	<i>TMEM45A</i>	3q12.2	10	55,6	14	42,4	7	3	4
32	<i>SOX14</i>	3q22-q23	10	55,6	14	42,4	8	2	4
33	<i>RAP2B</i>	3q25.2	9	50,0	16	48,5	8	1	7
34	<i>FGD5</i>	3p25.1	9	50,0	14	42,4	5	4	5
35	<i>B3GALNT1</i>	3q25	9	50,0	13	39,4	6	3	4
36	<i>HMGB1L5(Pseudo)</i>	3p24	8	44,4	18	54,5	6	2	10
37	<i>LRRC58</i>	3q13.33	8	44,4	16	48,5	4	4	8
38	<i>KBTD8</i>	3p14	8	44,4	15	45,5	7	1	7
39	<i>NKIRAS1/RPL15</i>	3p24.2	8	44,4	14	42,4	7	1	6
40	<i>LRRC3B</i>	3p24	8	44,4	12	36,4	4	4	4
41	<i>EPHB1</i>	3q21-q23	8	44,4	12	36,4	5	3	4
42	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	8	44,4	11	33,3	5	3	3
43	<i>CMTM8</i>	3p22.3	7	38,9	17	51,5	7	0	10
44	<i>GPR149</i>	3q25.2	7	38,9	14	42,4	6	1	7
45	<i>PPM1M</i>	3p21.2	7	38,9	13	39,4	6	1	6
46	<i>RRP9/PARP3</i>	3p21.2	6	33,3	13	39,4	4	2	7
47	<i>PDZRN3</i>	3p13	6	33,3	12	36,4	4	2	6
48	<i>DZIP1L</i>	3q22.3	5	27,8	13	39,4	5	0	8
49	<i>EPHB3</i>	3q21-qter	5	27,8	11	33,3	5	0	6
50	<i>KY</i>	3q22.2	4	22,2	13	39,4	2	2	9

зразків 2 стадії, та 17 зразків пухлин 3-4 стадії захворювання. Фрагмент результатів гібридизації на NotI-мікропанелях наведений на рис. 3.5.

№	№ клону	1 стадія	2 стадія	3-4 стадія	Ген/локус	Локус хромосоми
1	NotI0029				<i>NKIRAS1</i>	3p24.2
2	NotI0031				<i>RARBeta1</i>	3p24
3	NotI0126				<i>FLJ44898</i>	3q21.1
4	NotI0090				<i>CGGBP</i>	3p12
5	NotI0040				<i>ITGA9</i>	3p21.3
6	NotI0001				<i>MINT24</i>	3p25-3p26
7	NotI0033				<i>LRRC3B</i>	3p24
8	NotI0050				<i>LOC732138</i>	3p21.32
9	NotI0103				<i>ROPNI</i>	3q21.1
10	NotI0110				<i>GATA-2</i>	3q21.3
11	NotI0079				<i>PRICKLE2</i>	3p14
12	NotI0105				<i>ALDH1L1</i>	3q21.2
13	NotI0111				<i>GATA2</i>	3q21.3
14	NotI0043				<i>GORASP1</i>	3p22-p21.3
15	NotI0085				<i>FOXP1</i>	3p14.2
16	NotI0141				<i>RAP2B</i>	3q25.2
17	NotI0008				<i>VHL</i>	3p26-p25
18	NotI0055				<i>NBEAL2</i>	3p21.31
19	NotI0097				<i>LOC285205</i>	3q13.12
20	NotI0106				<i>CHST13</i>	3q21.2
21	NotI0074				<i>BHLHB2</i>	3p26
22	NotI0139				<i>ZIC4</i>	3q24
23	NotI0028				<i>UBE2E2</i>	3p24.2
24	NotI0062				<i>GNAI2</i>	3p21
25	NotI0107				<i>LOC650370</i>	3q21.2
26	NotI0121				<i>TRH</i>	3q21.3
27	NotI0125				<i>KY</i>	3q22.1
28	NotI0127				<i>PPP2R3A</i>	3q21.1
29	NotI0166				<i>FGF12</i>	3q28
30	NotI0019				<i>WNT7A</i>	3p25
31	NotI0012				<i>RPL32</i>	3p25.3
32	NotI0163				<i>BCL6</i>	3q27
33	NotI0142				<i>GPR149</i>	3q25.2
34	NotI0149				<i>SOX2</i>	3q26.3
35	NotI0180				<i>THRB</i>	3p24.3
36	NotI0026				<i>PLCL2</i>	3p24.3
37	NotI0041				<i>RBSP3</i>	3p21.33
38	NotI0048				<i>SNRK</i>	3p22.1
39	NotI0054				<i>TESSP2</i>	3p21.31
40	NotI0091				<i>MINA</i>	3q11.2
41	NotI0169				<i>C3ORF21</i>	3q28
42	NotI0177				<i>DHX30</i>	3p21.31
43	NotI0003				<i>LMCD1</i>	3p26-p24
44	NotI0084				<i>MITF</i>	3p14.1
45	NotI0145				<i>B3GALT3</i>	3q25
46	NotI0013				<i>IQSEC1</i>	3p25.2

Рис. 3.5. Приклад фрагменту профілю гібридизації зразків пухлин молочної залози на NotI-мікропанелях: жовті комірки – без змін; зелені зі штрихом – гетерозиготні делеції та/або метилювання, зелені – гомозиготні делеції та/або метилювання, червоні – ампліфікації та/або деметилювання.

Зі 180 NotI-зв'язаних клонів 3-ої хромосоми людини виявлено значущі зміни для 32 генів та/або локусів у пухлинах молочної залози (табл. 3.4.). Найбільші зміни (делеції та/або метилювання) більше 45 % зразків пухлин спостерігаються для генів та/або локусів *NKIRAS1*, *RARB1*, *FLJ44898*, *CGGBP*, *ITGA9*, *MINT24*, *LRRC3B*, *GATA2*, *PRICKLE2*, *GORASP1*, *FOXP1* та інші [555].

Таблиця 3.4.

Гени з найбільшим відсотком змін у пухлинах молочної залози

№	Ген/локус	Локалізація	Загальна кількість дел/мет	% від загальної кількості	кількість дел/мет 1-2 ст.	% змін у 1-2 ст.	кількість дел/мет 3-4 ст.	% змін у 3-4 ст.
1	<i>NKIRAS1</i>	3p24.2	25	67,6	18	60,0	7	41,2
2	<i>RARB1</i>	3p24	22	59,5	15	50,0	7	41,2
3	<i>FLJ44898</i>	3q21.1	22	59,5	16	53,3	6	35,3
4	<i>CGGBP</i>	3p12	21	56,8	15	50,0	6	35,3
5	<i>ITGA9</i>	3p21.3	19	51,4	14	46,7	5	29,4
6	<i>MINT24</i>	3p25-3p26	18	48,6	14	46,7	4	23,5
7	<i>LRRC3B</i>	3p24	18	48,6	10	33,3	8	47,1
8	<i>LOC732138</i>	3P21.32	18	48,6	12	40,0	6	35,3
9	<i>ROPNI</i>	3q21.1	18	48,6	13	43,3	5	29,4
10	<i>GATA2</i>	3q21.3	18	48,6	12	40,0	6	35,3
11	<i>PRICKLE2</i>	3p14	17	45,9	9	30,0	8	47,1
12	<i>ALDH1L1</i>	3q21.2	17	45,9	10	33,3	7	41,2
13	<i>GATA2</i>	3q21.3	17	45,9	12	40,0	5	29,4
14	<i>GORASP1</i>	3p22-p21.33	15	40,5	12	40,0	3	17,6
15	<i>FOXP1</i>	3p14.2	15	40,5	12	40,0	3	17,6
16	<i>RAP2B</i>	3q25.2	15	40,5	11	36,7	4	23,5
17	<i>VHL</i>	3p26-p25	14	37,8	10	33,3	4	23,5
18	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	14	37,8	9	30,0	5	29,4
19	<i>LOC285205</i>	3q13.12	14	37,8	9	30,0	5	29,4
20	<i>CHST13</i>	3q21.2	14	37,8	9	30,0	5	29,4
21	<i>BHLHB2</i>	3p26	13	35,1	8	26,7	5	29,4
22	<i>ZIC4</i>	3q24	13	35,1	8	26,7	5	29,4
23	<i>UBE2E2</i>	3p24.2	12	32,4	9	30,0	3	17,6
24	<i>GNAI2</i>	3p21	12	32,4	6	20,0	6	35,3
25	<i>LOC650370</i>	3q21.2	12	32,4	6	20,0	6	35,3
26	<i>TRH</i>	3q21.3	12	32,4	9	30,0	3	17,6
27	<i>KY</i>	3q22.1	12	32,4	9	30,0	3	17,6
28	<i>PPP2R3A</i>	3q21.1	12	32,4	5	16,7	7	41,2
29	<i>FGF12</i>	3q28	12	32,4	8	26,7	4	23,5
30	<i>WNT7A</i>	3p25	11	29,7	8	26,7	3	17,6
31	<i>RPL32</i>	3p25.3	10	27,0	7	23,3	3	17,6
32	<i>BCL6</i>	3q27	10	27,0	6	20,0	4	23,5

3.1.5. Порівняльний аналіз виявлених за допомогою NotI-мікропанелей змін пухлино-асоційованих генів та потенційних генів супресорів росту пухлин у епітелійних пухлинах. Аналіз результатів наших досліджень у чотирьох локалізаціях епітелійних пухлин (рак товстого кишечника (РТК), рак яєчника (РЯ), рак передміхурової залози (РПЗ), рак молочної залози (РМЗ)) [552-555] та даних інших дослідників у ще трьох

локалізаціях епітелійних пухлин (світло клітинний рак нирки (РН), рак шийки матки (РШМ), рак легені (РЛ)) методом NotI-мікропанелей [29-31, 556] виявив (табл. 3.5) 74 гени та/або локуси, які мають значущі зміни (делеції та/або метилювання) від однієї до семи локалізацій.

Необхідно відмітити, що найбільша кількість змін - це гетерозиготні та гомозиготні делеції або метилювання у всіх представлених семи локалізаціях епітелійних пухлин. Ампліфікація та деметилювання є досить рідкісним випадком у цих типах пухлин у порівнянні з лейкемією [557]. Отже, делеції та метилювання були в центрі уваги наших досліджень. Із 74 виявлених генів та/або локусів, 40 генів та/або локусів із змінами - з короткого плеча (3p) хромосоми 3 та 34 гена та/або локусу з довгого плеча (3q) 3-ої хромосоми. Так, 5 генів (*FOXP1*, *LRRC3B*, *NKIRAS1*, *RBSP3 (CTDSPL)*, *ZIC4*) мають зміни у всіх семи видах досліджених пухлин. Вони знаходяться в регіоні 3p14-3p24.

П'ять генів та/або локусів мають зміни у 6-и з 7-и локалізацій епітелійних пухлин: *ITGA9*, *GORASP1*, *IQSEC1*, *CGGBP1*, *PPP2R3A*.

Зміни у 5-и з 7-и локалізацій епітелійних пухлин мають 10 генів та/або локусів: *WNT7A*, *NBEAL2*, *VHL*, *LOC285205*, *FGF12*, *ALDH1L1*, *GATA2*, *PLCL2*, *ABHD5/C3orf77(TOPAZ1)*, *EPHB1*. Гени *GORASP1*, *IQSEC1*, *CGGBP1*, *NBEAL2* та *VHL* локалізовані в регіоні 3p12-3p26; гени *PPP2R3A*, *FGF12*, *ALDH1L1*, *GATA2* і *PLCL2* розташовані в області 3q13-3q28. Велика кількість генів з однаковими змінами в різних епітелійних пухлинах свідчить про загальні механізми розвитку раку та інактивація цих у канцерогенезі є однією з ознак потенційних генів супресорів росту пухлин.

Двадцять два гени з 74 мають зміни лише в одному типі пухлин. Значна частина з них (13 генів та/або локусів) зустрічається при раку передміхурової залози. Це може свідчити про специфічні механізми канцерогенезу передміхурової залози, які відрізняються від інших локалізацій. Слід зазначити, що раніше багато досліджень були зосереджені на вивченні генів 3p плеча [22, 558, 559], при цьому мало уваги приділялося генам 3q плеча. Результати NotI-мікропанелей показують залучення генів 3q плеча у канцерогенезі епітелійних

Таблиця 3.5.

**Гени та/або локуси зі значущим відсотком змін у семи локалізаціях
епітелійних пухлин за даними аналізу NotI-мікропанелей**

№	Кількість локалізацій	Ген/локус	Локус хромосоми	РЯ	РТК	РМЗ	РШМ	РЛ	РН	РПЗ
1	2	3		5	6	7	8	9	10	11
1	7	<i>FOXP1</i>	3p13	*	*	*	*	*	*	*
2	7	<i>LRRC3B</i>	3p24.1	*	*	*	*	*	*	*
3	7	<i>NKIRAS1</i>	3p24.2	*	*	*	*	*	*	*
4	7	<i>RBSP3 (CTDSPL)</i>	3p22.2	*	*	*	*	*	*	*
5	7	<i>ZIC4</i>	3q24	*	*	*	*	*	*	*
6	6	<i>ITGA9</i>	3p22.2	*	*	*	*	*		*
7	6	<i>GORASP1</i>	3p22.2	*	*		*	*	*	*
8	6	<i>IQSEC1</i>	3p25.2-p25.1	*	*		*	*	*	*
9	6	<i>CGGBP1</i>	3p11.1	*	*	*	*	*		*
10	6	<i>PPP2R3A</i>	3q22.2-q22.3	*	*	*	*	*		*
11	5	<i>WNT7A</i>	3p25.1	*	*		*	*		*
12	5	<i>NBEAL2</i>	3p21.31	*	*			*	*	*
13	5	<i>VHL</i>	3p25.3		*	*	*	*	*	
14	5	<i>LOC285205</i>	3p13.12	*	*	*		*		*
15	5	<i>FGF12</i>	3q28-q29	*		*	*	*		*
16	5	<i>ALDH1L1</i>	3q21.3			*	*	*	*	*
17	5	<i>GATA2</i>	3q21.3	*	*	*		*		*
18	5	<i>PLCL2</i>	3p24.3		*		*	*	*	*
19	5	<i>ABHD5/TOPAZ1</i>	3p21.33/3p21.31	*			*	*	*	*
20	5	<i>EPHB1</i>	3q22.2	*			*	*	*	*
21	4	<i>NUDT16P</i>	3q22.1	*	*			*		*
22	4	<i>ROPN1</i>	3q21.1	*		*		*		*
23	4	<i>UBE2E2</i>	3p24.3		*	*	*	*		
24	4	<i>GNAI2</i>	3p21.31	*				*	*	*
25	4	<i>PRICKLE2</i>	3p14.1	*			*	*	*	
26	4	<i>RPL32</i>	3p25.2				*	*	*	*
27	4	<i>THRB</i>	3p24.2	*	*		*	*		
28	4	<i>BCL6</i>	3q27.3	*		*		*		*
29	4	<i>BHLHE40</i>	3p26.1			*	*	*		*
30	4	<i>FGD5</i>	3p25.1				*	*	*	*
31	4	<i>LRRN1</i>	3p26.2	*			*	*	*	
32	3	<i>FBLN2</i>	3p25.1	*				*		*
33	3	<i>KY</i>	3q22.2		*			*		*
34	3	<i>PPM1M</i>	3p21.2	*					*	*
35	3	<i>MINA</i>	3q11.2			*		*		*
36	3	<i>TRH</i>	3q22.1	*		*		*		
37	3	<i>LOC285375</i>	3p25.1	*			*			*

Продовж. табл. 3.5.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
38	2	<i>MINT24</i>	3p26		*	*				
39	2	<i>RARB</i>	3p24.2		*	*				
40	2	<i>LOC732138</i>	3p21.32		*	*				
41	2	<i>GPR149</i>	3q25.2					*		*
42	2	<i>LMCD1</i>	3p25.3		*			*		
43	2	<i>RAP2B</i>	3q25.2			*				*
44	2	<i>SOX2</i>	3q26.33			*				*
45	2	<i>PAQR9</i>	3q23	*				*		
46	2	<i>LOC650370</i>	3q21.2		*	*				
47	2	<i>CHST13</i>	3q21.3	*		*				
48	2	<i>SOX14</i>	3q22.3				*			*
49	2	<i>ANKRD28</i>	3p25.1		*			*		
50	2	<i>FSTL1</i>	3q13.33			*				*
51	2	<i>PDZRN3</i>	3p13				*			*
52	1	<i>FLJ44898</i>	3q21.1			*				
53	1	<i>B3GALNT1</i>	3q26.1							*
54	1	<i>EPHB3</i>	3q27.1							*
55	1	<i>KBTBD8</i>	3p14.1							*
56	1	<i>LRRC58</i>	3q13.33							*
57	1	<i>PARP3</i>	3p21.2							*
58	1	<i>TMEM45A</i>	3q12.2							*
59	1	<i>ACPL2 (PXYLPI)</i>	3q23			*				
60	1	<i>CHCHD6/C3orf46</i>	3q21.3							*
61	1	<i>CKLFSF6</i>	3p22.3		*					
62	1	<i>CLASP2</i>	3p22.3							*
63	1	<i>CMTM8</i>	3p22.3							*
64	1	<i>DZIP1L</i>	3q22.3							*
65	1	<i>HMGB1L5(Pseudo)</i>	3p24.3							*
66	1	<i>MANF</i>	3p21.2							*
67	1	<i>MITF</i>	3p13					*		
68	1	<i>USP19</i>	3p21.31							*
69	1	<i>MOBP</i>	3p22.1	*						
70	1	<i>DCBLD2</i>	3q12.1; 3	*						
71	1	<i>FNDC3B</i>	3q26.31			*				
72	1	<i>C3ORF21 (XXYLT1)</i>	3q29			*				
73	1	<i>DHX30</i>	3p21.31			*				
74	1	<i>ABTB1/PODXL2</i>	3q21	*						

Примітка. * - статистично-значущі зміни при FDR=0,2

пухлин в усіх семи локалізаціях. Наприклад, ген *ZIC4* кодує члена сімейства *Zic*, що є важливим у процесах розвитку. Він бере участь у регуляції

транскрипції РНК-полімеразою II, але має дуже низький рівень експресії. Він має делеції та/або метилювання у всіх семи локалізаціях пухлин. Наші дані підтверджуються іншими дослідниками на іншого типу раку (рак сечового міхура) [560].

Важливо відзначити, що ці епігенетичні зміни можуть бути виявлені у біологічних рідинах, таких як сеча, тоді як неможливо виявити рівні експресії як для *ZIC4*.

Інший ген від 3q плеча, який має делеції та/або метилювання у 6 локалізаціях пухлин це *PPP2R3A*. Він кодує одну з регуляторних субодиниць білкової фосфатази 2, яка бере участь у негативному контролі росту та поділу клітин [561]. Проте генетичні та/або епігенетичні зміни цього гена у злоякісних епітелійних пухлинах не були відомі раніше до наших досліджень.

Наступні чотири гени з 3q плеча хромосоми 3, які мають делецію та/або метилювання у 5 локалізаціях епітелійних пухлин, це *FGF12*, *ALDH1L1*, *GATA2*, *EPHB1*. Ген *FGF12* є членом сімейства FGF, які беруть участь у різноманітних біологічних процесах, включаючи ріст клітин, морфогенез, репарацію тканин, розвиток пухлини та метастазування [562]. Показано метилювання *FGF12* у колоректальних раках [563]. Наше дослідження підтвердило цей тип епігенетичних змін *FGF12* у раку передміхурової залози [554]. Він показаний як потенційний біомаркер у раку стравоходу [564]. Ген *ALDH1L1* кодує альдегіддегідрогеназу 1 член сім'ї L1. Втрата функції (епігенетична інактивація) або експресії взагалі *ALDH1L1* асоціюються з підвищенням рухливості клітин, зниженням апоптозу та прогресуванням раку [565]. З іншого боку, *ALDH1L1* є маркерним геном стовбурових ракових клітин, і є біомаркером раку товстої кишки, який пов'язаний з поганим прогнозом [566]. Ген *GATA2* кодує члена сімейства GATA транскрипційних факторів цинкового-пальця. Він проводить транскрипційні сигнали, зокрема, з андрогенового рецептора [567]. *GATA2* має багатогранну функцію при агресивних раках передміхурової залози і є надзвичайно привабливою мішенню для лікування високо агресивного раку передміхурової залози [568]. Експресія

GATA2 пов'язана з поганим прогнозом при гострій мієлоїдній лейкемії [569]. Ген *EPHB1* кодує трансмембранний білок, який є рецептором ефрину-В1 (EphB1). Втрата його експресії може пов'язуватися з агресивними фенотипами раку при гострому мієлоїдному лейкозі [570]. Показана супресорна функція гена *EPHB1* при раку молочної залози, товстого кишечника та раку легені [571].

Технологія NotI-мікропанелей дає змогу виявити генетичні та/або епігенетичні зміни у злоякісних, доброякісних пухлинах різних локалізацій, які мають як загально-пухлинний характер, так і специфічний для певного виду пухлин. Крім того, наші дослідження по встановленню природи знайдених порушень показали наявність як генетичних, так і епігенетичних аберацій для генів з високим відсотком змін за даними NotI-мікропанелей. Нами підтверджено вплив цих порушень на експресію досліджуваних генів у епітелійних пухлинах. Наявність великої кількості змін, що притаманні лише для раку передміхурової залози та не виявлені у інших досліджуваних локалізаціях пухлин наводить на припущення про специфічні характеристики канцерогенезу та певні особливі механізми прогресування раку передміхурової залози. Ці факти потребують більш детальних досліджень. Що й стало наступним нашим завданням.

Отже, за результатами NotI-мікропанелей виявлено десятки значущих генетичних та/або епігенетичних порушень генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини у пухлинах яєчника, кишечника, молочної та передміхурової залоз, які свідчать про інактивацію кластерів генів-супресорів росту пухлин та потенційних генів-супресорів пухлин на 3p- та 3q-плечі 3-ої хромосоми людини у епітелійних пухлинах.

Аналіз результатів NotI-мікропанелей 3-ої хромосоми людини на 7-и локалізаціях епітелійних пухлин виявив 74 гени та/або локуси зі значущими генетичними/епігенетичними порушеннями, з яких 20 характерні для 5-7 типів пухлин, а 23 гени та/або локуси є пухлино-специфічними, найбільша кількість

яких виявлена для пухлин передміхурової залози, що свідчить про особливості канцерогенезу, відмінні від інших видів епітелійних пухлин.

Роботи, що опубліковані за матеріалами цього підрозділу: [552-556].

3.2. Визначення типу змін генів (генетичних або епігенетичних) за даними NotI-мікропанелей та відкритих баз даних й встановлення рівнів відносної експресії досліджуваних генів

Сучасна технологія широкомасштабного скринінгу - NotI-мікропанелей дозволила виявити десятки генів та/або локусів, що мають порушення у низці пухлин епітелійного походження. Виходячи з функцій цих генів нашим завданням було провести валідацію іншими методами та встановити який саме характер мають ці зміни: генетичний або епігенетичний, враховуючи, що епігенетичні порушення можна виявляти на дуже ранніх стадіях онкологічних захворювань у біологічних рідинах людини [572, 573]. Крім того, важливим завданням є виявлення впливу знайдених порушень на експресію пухлино-асоційованих генів.

Крім генів, що показали значущі зміни за даними NotI-мікропанелей, ми досліджували генетичні і епігенетичні зміни та експресію деяких генів 3-ої хромосоми, які не мають NotI-сайту, з регіону (LUCA) відомого гена-супресора росту пухлин *RASSF1A* 3p21.31. Нами виявлено зміни делеції та/або метилювання за допомогою NotI-мікропанелей у декількох локалізаціях пухлин генів з цього регіону (3p21.31). Серед них гени *NBEAL2*, *GNAI2*, *TOPAZ1*. У цьому ж регіоні знаходяться пухлино-асоційовані гени *GPX1* та *SEMA3B*, які мають суперечливі функції та зміни у канцерогенезі [574, 575]. Сімейство генів *GPX*, які кодують селеновмісні протеїни відіграє дуже важливу роль у захисті клітин від вільних радикалів та має багато функцій при розвитку пухлин [576]. Тому ми дослідили генетичні та епігенетичні зміни цих генів та встановили рівні їх відносної експресії. Крім того, ми маємо дані інших дослідників, які виявили зміни генів з регіону 3p21.31, це *HYAL1*, *HYAL2*, *RASSF1A* (3p21.31) у

недрібноклітинному раку легені [29]. Ці дані вказують на можливість множинної інактивації генів-супресорів та потенційних генів-супресорів в 3-ій хромосомі людини.

3.2.1. Аналіз статусу метилювання промоторних ділянок генів для виявлення епігенетичних порушень у епітелійних пухлинах. Для встановлення характеру знайдених змін генетичних та/або епігенетичних за допомогою NotI-мікропанелей ми провели дослідження можливих епігенетичних порушень для низки генів та/або локусів, які показали великий відсоток змін методами метил-специфічної ПЛР та бісульфітного секвенування.

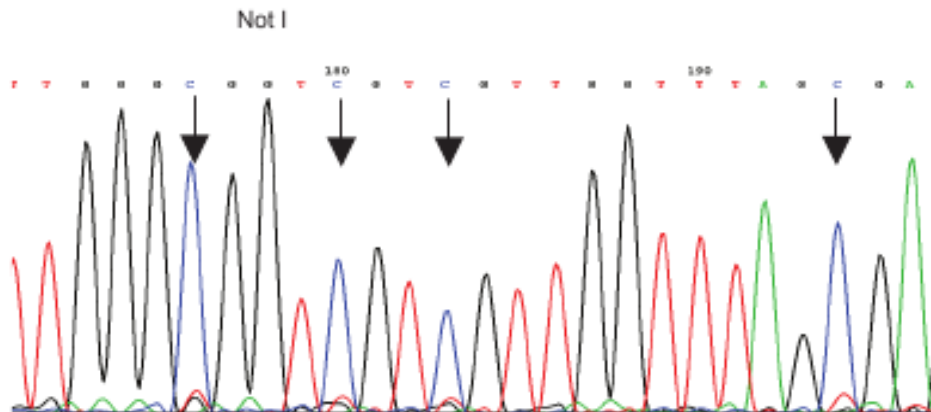
Так, на зразках геномної ДНК пухлин яєчника ми перевірили методом бісульфітного секвенування метилювання промоторних ділянок генів *LRRC3B* (№ 12 та 13), *ITGA9* (№ 1, 2 і 3), *THRβ* (№ 9 і 10), *RBSP3 (CTDSPL)* (№ 14, 15 і 16), який підтвердив наявність метилювання промоторів досліджуваних генів. Як приклад наведено результати бісульфітного секвенування для гена *ITGA9* (рис. 3.6, 3.7). Для гена *ITGA9* відібрано три зразки (№ 1, 2 та 3). І тільки зразок № 2 не мав метилювання промоторної ділянки геномної ДНК [552].

Дослідження метилювання промоторної ділянки гена *ITGA9* проведено на двох локалізаціях пухлин, а саме яєчника та кишечника методом бісульфітного секвенування. Досліджувана ділянка геномної ДНК містила 14 CpG-динуклеотидів (рис. 3.6a), з яких 2 пари (8 та 9) належали до NotI-сайту. Два зразки пухлин яєчника, в яких аналізували по 8 клонів (рис. 3.7a), показали 41,1 та 43,75% загального метилювання досліджуваної ділянки та 43,75% метилювання CpG-динуклеотидів NotI-сайту. Дослідження двох зразків пухлин кишечника з делецією/метилюванням гена *ITGA9* за даними NotI-мікропанелей показало 66,7 та 39,3% метилювання 14-и пар CpG-динуклеотидів (рис. 3.7б) та 83,3 й 50% метилювання CpG-динуклеотидів NotI-сайту за результатами бісульфітного секвенування 6-и клонів кожного зразка. У третьому зразку пухлин кишечника, який не мав змін за даними NotI-мікропанелей (рис. 3.7б, зразок 3) не виявлено метилювання у досліджуваній ділянці ДНК гена *ITGA9*.

a

Номер CpG 1 2 3 4
 CCCTGGGGTCCAGCCCAGAGCGTGGGGGGAGAGCCGCTAGAGTTGTCTCCTCCGCCGC
 5 6 7
 CCAGCTAGACTCGGCTTCACTCTCTGAATCGAAAAGTAACTTGGCTCCTCTGCCTCCGG
 8 9 10 11 12 13
 GCGGCCGCCGCTGGCCCAGCGAGCCTCCTGAACCTCGCAGGGCCTGGAGGAGTCCGGGC
 14
 ACTGGAGCTGCACCCCTCCCCTGGTTTGGGGAACCCCTGAGGAAGGAGTATAGCCTCTC

б



в

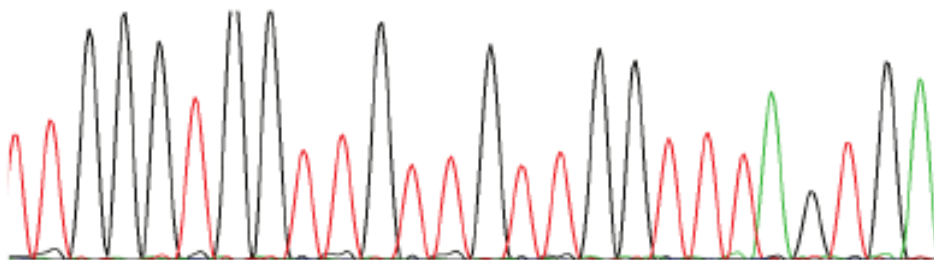


Рис. 3.6. Фрагмент промотора гена *ITGA9*: а - послідовність промоторної ділянки з вказаними праймерами (жирний шрифт) та 14-ма парами CpG-динуклеотидів; б - фрагмент хроматограми з метильованим NotI-сайтом та CpG-динуклеотидами; в - фрагмент хроматограми з неметильованим NotI-сайтом

Отже, результати встановлення статусу метилювання промоторів досліджуваних генів підтверджують дані NotI- мікропанелей про наявність епігенетичних порушень у пухлинах яєчника та товстого кишечника.

Інший метод, який дозволяє встановлювати статус метилювання CpG-динуклеотидів – метил-специфічна ПЛР. Цим методом нами досліджено

а

		Зразок 1										Зразок 3							
CpG		Номер клону									CpG	Номер клону							
		1	2	3	4	5	6	7	8			1	2	3	4	5	6	7	8
1		+	+	+	+	+	+	+			1	+	+	+	+	+	+		
2		+	+	-	+	+	+	+			2	+	+	+	+	+	+		
3		+	+	+	+	+	+	+			3	+	+	+	+	+	+		
4		+	+	+	+	+	+	+			4	+	+	+	+	+	+		
5		+	+	+	+	+	+	+			5	+	+	+	+	+	+		
6		+	+	+	+	+	+	+			6	+	+	+	+	+	+		
7		+	+	+	+	+	+	+			7	+	+	+	+	+	+		
8		+	+	+	+	+	+	+			8	+	+	+	+	+	+		
9		+	+	+	+	+	+	+			9	+	+	+	+	+	+		
10		+	+	+	+	+	+	+			10	+	+	+	+	+	+		
11		+	+	+	+	+	+	+			11	+	+	+	+	+	+		
12		+	+	+	+	+	+	+			12	+	+	+	+	+	+		
13		+	+	+	+	+	+	+			13	+	+	+	+	+	+		
14		+	+	+	+	+	+	+			14	+	+	+	+	+	+		

б

		Зразок 1.								Зразок 2.								Зразок 3.					
CpG		Номер клону							CpG	Номер клону							CpG	Номер клону					
		1	2	3	4	5	6			1	2	3	4	5	6			1	2	3	4	5	6
1		+	+	+	+	+	+		1	+	+	+	+	+	+		1						
2		+	+	+	+	+	+		2	+	+	+	+	+	+		2						
3		+	+	+	+	+	+		3	+	+	+	+	+	+		3						
4		+	+	+	+	+	+		4	+	+	+	+	+	+		4						
5		+	+	+	+	+	+		5	+	+	+	+	+	+		5						
6		+	+	+	+	+	+		6	+	+	+	+	+	+		6						
7		+	+	+	+	+	+		7	+	+	+	+	+	+		7	+					
8		+	+	+	+	+	+		8	+	+	+	+	+	+		8	+					
9		+	+	+	+	+	+		9	+	+	+	+	+	+		9						
10		+	+	+	+	+	+		10	+	+	+	+	+	+		10						
11		+	+	+	+	+	+		11	+	+	+	+	+	+		11						
12		+	+	+	+	+	+		12	+	+	+	+	+	+		12						
13		+	+	+	+	+	+		13	+	+	+	+	+	+		13						
14		+	+	+	+	+	+		14	+	+	+	+	+	+		14						

Рис. 3.7. Профілі метилювання 14-и CpG-динуклеотидів за результатами бісульфітного секвенування гена *ITGA9* у пухлинах яєчника (а) та товстого кишечника (б). Примітка: “+” - метильовані пари; “-” - неметилювані пари. CpG-динуклеотиди 8 та 9 асоційовані з NotI-сайтом

метилювання промоторних ділянок низки генів у пухлинах нирки. Так, вивчення метилювання промоторних ділянок геномної ДНК генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICLE2*, *LRRC3B*, *SEMA3B*, *GPX1*, *GPX3*, *GPX4* які мали значущі зміни у пухлинах нирки за даними NotI-мікропанелей [30] та відкритих баз даних не підтвердило наявності метилювання досліджуваних регіонів для генів

NKIRAS1, *PPM1M*, *PRICLE2*, *GPX1*, *GPX3*, *GPX4* (дані не наведено) [577-584]. Ці дані дають можливість припустити, що ці гени можуть мати генетичні порушення у пухлинах нирки.

Метилування промоторної ділянки ДНК гена *LRRC3B* вивчали на зразках пухлин нирки як за допомогою метил-специфічної ПЛР, так і за допомогою бісульфітного секвенування [579]. Приклад електрофореграми МСП наведено на рис. 3.8.

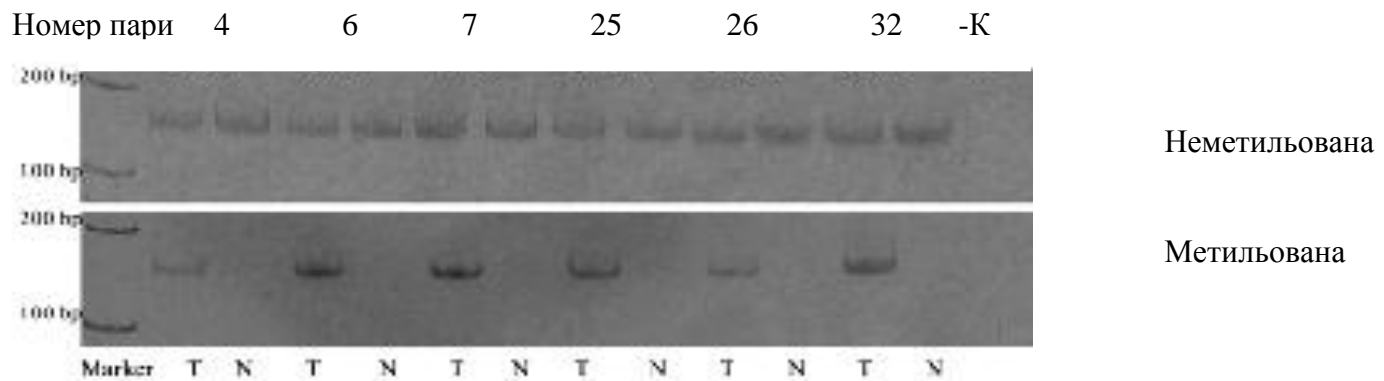


Рис. 3.8. Фрагмент електрофореграми продуктів метил-специфічної ПЛР гена *LRRC3B* у зразках пухлин (Т) та умовно-нормальних тканин (N) нирки з неметильованими та метильованими праймерами. –К – негативний контроль

Раніше продемонстровано, що критичною для регуляції експресії гена є ділянка промотору гена *LRRC3B* становить від -195 до +323 б.п. (16) і містить два CpG-острівці. Тому в дослідженні за допомогою метил-специфічної ПЛР, використовували праймери для метильованої та неметильованої ДНК ділянки промотору гена *LRRC3B* (від -256 до -105 н.п.).

Перевірка статусу метилування гена *LRRC3B* у пухлинах нирки була проведена на 35 зразках пухлин. З них 3 пухлини нирки 1 стадії (T1N0M0), 20 пухлин 2 стадії (T2N0M0) та 12 пухлин 3 стадії (T3N0M0- T3NxMx).

Результати МСП, які наведені у табл. 3.6. показали, що 15 зразків з 35 мають етильовані CpG-динуклеотиди, що входять у склад праймерів, це становить майже 43% зразків пухлин нирки. Слід відмітити, що умовні норми не мали метилування цих CpG-динуклеотидів взагалі.

Таблиця 3.6.

Статус метилювання гена *LRRC3B* у пухлинах нирки за результатами метил-специфічної ПЛР

№ зразка	TNM	Статус метилювання	№ зразка	TNM	Статус метилювання
1	T3N0M0	-	19	T2N0M0	-
2	T2N0M0	+	20	T1N0M0	-
3	T3N0M0	+	21	T2N0M0	-
4	T3N0M0	+	22	T3N0M0	-
5	T2N0M0	+	23	T3N0M0	-
6	T3N0M0	+	24	T2N0M0	-
7	T2N0M0	+	25	T2N0M0	+
8	T2N0M0	-	26	T2N0M0	+
9	T3N0M0	-	27	T2N0M0	+
10	T2N0M0	+	28	T2N0M0	-
11	T3N0M0	+	29	T2N0M0	-
12	T3N0M0	-	30	T2N0M0	+
13	T3N0M0	-	31	T2N0M0	-
14	T2N0M0	-	32	T2N0M0	+
15	T1N0M0	-	33	T3N0M0	+
16	T2N0M0	-	34	T2N0M0	-
17	T1N0M0	-	35	T2N0M0	+
18	T3N0M0	-			

Для перевірки результатів дослідження МСП ми провели вивчення метилювання ПЛР-продукту для 7 зразків пухлин нирки за допомогою секвенування. Воно підтвердило точність визначення та наявність метилювання ДНК за допомогою аналізу МСП. Продукт МСП метильованого гена *LRRC3B* містив 8 CpG-динуклеотидів. Результати аналізу МСП-секвенування для гена *LRRC3B* представлені на рис. 3.9.

Середній показник метилювання промоторної ділянки гена *LRRC3B* становить більш ніж 65%. Ці результати були підтверджено і бісульфітним секвенуванням, які підтвердили результати МСП та МСП-секвенування [579].

Наступний ген, для якого вивчено статус метилювання - *SEMA3B*. Він розташований у регіоні 3p21.3, який має назву LUCa та в якому виявлено часті

Зразок	CpG-пари							
2	■	■	□	■	■	■	■	■
3	■	■	■	□	■	■	■	■
4	■	■	■	■	■	■	■	■
5	■	■	■	■	■	■	■	■
6	■	■	■	■	■	■	■	■
7	■	■	■	■	■	■	■	■
10	■	■	■	■	■	■	■	■

Рис. 3.9. Результати секвенування промоторної ділянки гена *LRRC3B* на наявність метилювання CpG-динуклеотидів. □ - 0-20% метилювання клонів; ■ - 21-40% метилювання клонів; ■ - 41-80% метилювання клонів; ■ - 81-100% метилювання клонів

порушення у злоякісних новоутвореннях [297, 585]. Білок семафорин 3, який кодується цим геном, приймає участь у процесах проліферації, ангиогенезу, апоптозу, міграції клітин [586-588] та має суперечливі функції у канцерогенезі. Ген *SEMA3B* складається з 18 екзонів і містить два CpG-острівці: один розташований в області промотору (1-й CpG-острівець, hg38 / chr3: 50,267,308-50,267,797, 22 CpG-динуклеотида), а інший - у першому інтроні (2-й CpG-острівець, hg38 / chr3: 50,268,972-50,269,271, 12 CpG-динуклеотидів). Ми проаналізували профіль метилювання промоторної ділянки гена *SEMA3B* бісульфітним секвенуванням та МСП у двох локалізаціях раку: рак нирки та рак легені. (рис 3.10а, б) [589].

Аналіз результатів бісульфітного секвенування у 25 первинних пухлинах нирки наведено на рис. 3.10а. Метилювання промоторного CpG-острівця спостерігалось у 11 з 25 первинних пухлин нирки. Серед парних гістологічно нормальних тканин, метильовані CpG-динуклеотида були виявлені лише у 2 з 25 випадків пухлин нирки (рис. 3.10б).

Далі ми оцінили частоти метилювання обох CpG-острівців гена *SEMA3B* методом метилспецифічної ПЛР, використовуючи репрезентативний набір пухлин нирки (83 пари зразків) 1-4 стадії захворювання (табл. 3.7). Частота метилювання CpG-острівця промотору *SEMA3B* становила 52% (43/83).

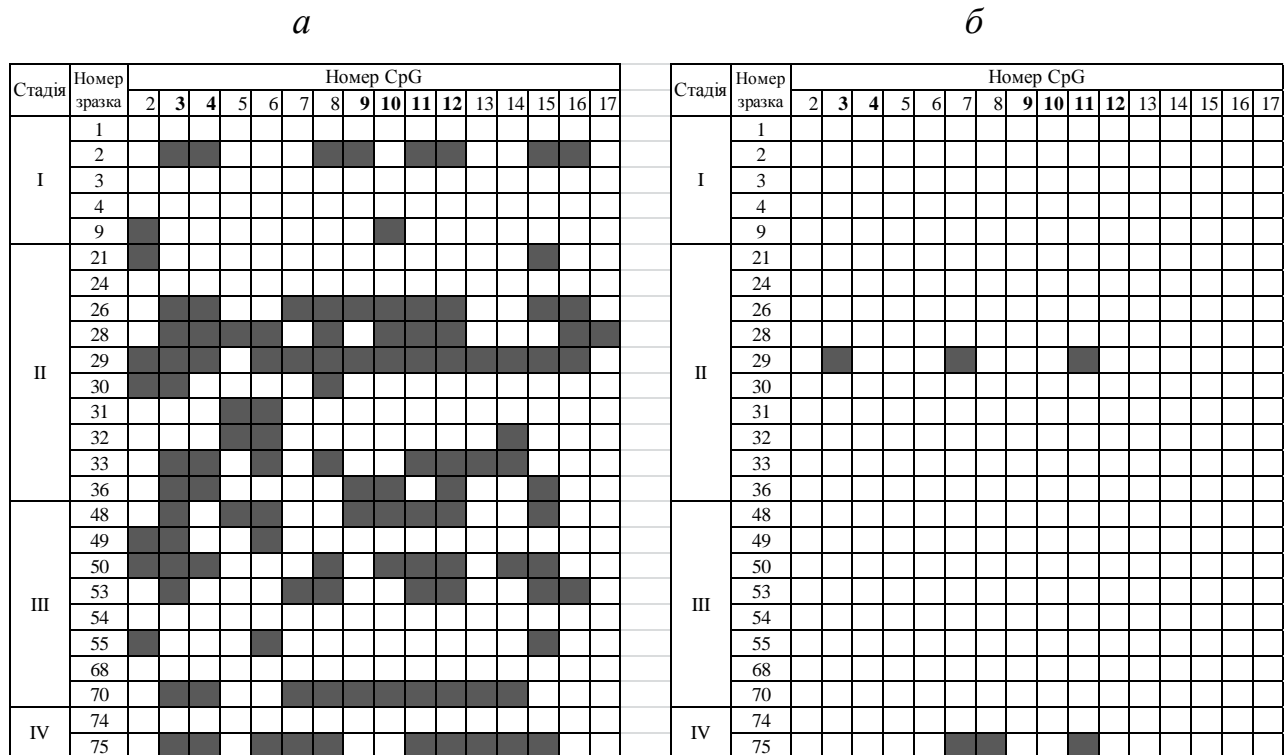


Рис. 3.10. Профіль метилювання промоторного CpG-острівця гена *SEMA3B* у пухлинах нирки (*a*) та умовно-нормальних тканинах нирки (*б*) за даними бісульфітного секвенування. ■ - метильовані CpG-динуклеотиди, □ - неметилювані CpG-динуклеотиди.

Інтронний CpG-острівець був метильований менше, ніж промоторний острівець - 39% (32/83). Частоти метилювання обох острівців були значно вищими в тканинах пухлини, ніж у парних гістологічних нормах ($p < 0,001$).

Аналіз профілю метилювання 16-и CpG-динуклеотидів промотору *SEMA3B* також проведено на 12-и недрібноклітинних пухлинах легені (рис. 3.11а, б). З них 5 аденокарцином легені різних стадій та 7 плоскоклітинних карцином легені різних стадій та їх умовно-нормальних тканинах. Частота метилювання за даними бісульфітного секвенування складала $>40\%$ від аналізованих CpG-динуклеотидів.

Метилювання виявлено у 2 з 5-и аденокарцином легені (обидва зразки 3-ої стадії) та всіх семи плоскоклітинних карцином легені у 2-12 CpG-динуклеотидах промоторної ділянки гена *SEMA3B*. Для підтвердження частот метилювання обох CpG-острівців *SEMA3B* ми провели дослідження на іншому

Таблиця 3.7.

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

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

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

сеті пухлин легені методом МСП. Для цього використано 38 зразків недрібноклітинних пухлин легені різних стадій та УНТ, з яких 16 аденокарцином легені та 22 плоскоклітинні карциноми легені [589]. Результати МСП двох CpG-острівців гена *SEMA3B* наведені у табл. 3.8.

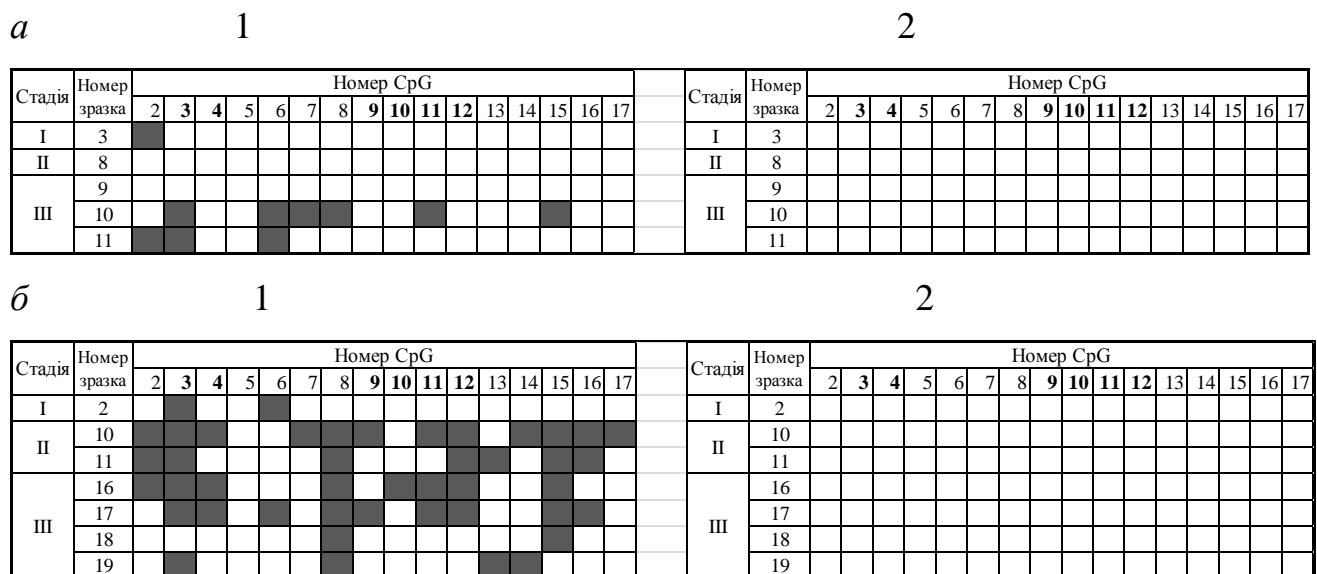


Рис. 3.11. Профіль метилювання промоторного CpG-острівця гена *SEMA3B* у недрібноклітинних пухлинах легені (1) та умовно-нормальних тканинах (2) за даними бісульфітного секвенування.: (а) аденокарциноми легені (Б) плоскоклітинні карциноми легені. ■ - метильовані CpG-динуклеотиди, □ - неметильовані CpG-динуклеотиди

Таблиця 3.8.

**Частота метилювання двох CpG-острівців гена *SEMA3B* у
недрібноклітинних пухлинах легені**

Стадії	Аденокарциноми легень							
	Промоторні CpG-пари (3, 4)				Інтронні CpG-пари (9-12)			
	Пухлини		УНТ		Пухлини		УНТ	
	№ мет	% мет	№ мет	% мет	№ мет	% мет	№ мет	% мет
I (n=6)	2	33	0	0	2	33	0	0
II (n=2)	1	50	0	0	1	50	0	0
III (n=7)	3	43	1	14	2	29	0	0
IV (n=1)	1	100	0	0	1	100	0	0
Всього (n=16)	7	44	1	6	6	38	0	0
p-рівні *П/УНТ	p=0,04				p=0,02			
Стадії	Плоскоклітинні карциноми легень							
	Промоторні CpG-пари (3, 4)				Інтронні CpG-пари (9-12)			
	Пухлини		УНТ		Пухлини		УНТ	
	№ мет	% мет	№ мет	% мет	№ мет	% мет	№ мет	% мет
I (n=7)	1	14	1	14	0	0	0	0
II (n=8)	6	75	1	13	3	38	0	0
III (n=7)	3	43	0	0	4	57	0	0
IV (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-
Всього (n=22)	10	45	2	9	7	32	0	0
p-рівні *П/УНТ	p=0,02				p=0,01			

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

Частота метилювання промоторного CpG-острівця гена *SEMA3B* становить 44% (7/16) у аденокарциномах легені та 45% (10/22) у плоскоклітинних карциномах легені. Інтронний CpG-острівець має дещо нижчі показники метилювання, які становлять 38% (6/16) та 32% (7/22) у аденокарциномах та плоскоклітинних карциномах легені відповідно. В усіх досліджуваних групах пухлини легені мають статистично значуще підвищення метилювання обох CpG-острівців у порівнянні з УНТ (від p=0,04 до p=0,01).

Таким чином, метилювання обох CpG-острівців гена *SEMA3B* є ознакою раку нирки та легені і в подальшому може бути розцінене як потенційний біомаркер пухлин. Як і очікувалося, метилювання 1-го та 2-го *SEMA3B* CpG-

острівця не виявлено у зразках ДНК, виділених з лімфоцитів крові здорових донорів (n = 15) [589]. Дані МСП узгоджуються з результатами бісульфітного секвенування для зразків раку нирки й легені та умовно-нормальних тканин.

Для валідації результатів NotI-мікропанелей у пухлинах передміхурової залози ми провели бісульфітне секвенування 4 генів: три гени (*FGF12*, *GATA2*, *LMCD1*) мали високий відсоток делецій та/або метилювання у злоякісних пухлинах передміхурової залози, ген *TESSP2* використовували у якості негативного контролю [554]. У цьому експерименті використано 12 зразків аденокарцином передміхурової залози з СГ від 4 до 9 з високим відсотком змін за даними NotI-мікропанелей для проведення бісульфітного секвенування. На рис. 3.12 представлено приклад бісульфітного секвенування гена *FGF12*, який досліджено на зразку аденокарциноми передміхурової залози в високою сумою за шкалою Глісона. Ампліфікований та клонований регіон промотору гена *FGF12* містить 34 CpG-динуклеотиди, з яких два відносяться до NotI-сайту. Результати бісульфітного секвенування свідчать про метилювання NotI-сайту у 6 з 11 клонів (55%) та високий рівень метилювання всього досліджуваного регіону. Інші 11 зразків раку передміхурової залози показали 40-80% метилювання NotI-сайту гена *FGF12*. Також високий рівень метилювання промоторних ділянок (30-70%) знайдено для генів *GATA2* та *LMCD1*, тоді як метилювання контрольного гена *TESSP2*, який слугував негативним контролем, спостерігалось на рівні не вище 10%. Таким чином, результати бісульфітного секвенування співпадають з даними NotI-мікропанелей та підтверджують факт, що метилювання є частою подією у карциномах передміхурової залози.

Таким чином, нами підтверджено низку змін генів, виявлених у епітелійних пухлинах за допомогою NotI-мікропанелей, що мають епігенетичні зміни, а саме метилювання промоторів генів *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *RBSP3*, *SEMA3B*, *GATA2*, *LMCD1*, *FGF12*.

а

СрG номер 1 2
TGTAAAA**AGAGGAATCCTGGTTCCCTTCCAC**CGGGGGTCCC**GAGGTGCTTTGAGGAGG**
3 4
GAGAAAGGAGGGCGT**CCCCCTCTGGGGAGCCCACTCTCC**GGGCTTCTACTGACCTGG
5 6 7 8 9
TCTCCGCCTCACCGGCCTCTT**CGGGCCG****CTGCAGAAAG**CGCACTTTGCTGAACACCC
10 11 12 13 14 15 16
CGAGGACCGTGCCTCTCGCACAGGGAGCGCCCGTCTTTGCTGGGGCTGGAGCGGGCG
17 18 19 20 21 22
CTTGGAGGCCGACACTCGGTCGCTGTTGGACTCCCTCGCCTGCCG**TTCTGCCGGA**
23 24 25
TCAAGGAGCTGGCTATCGCCG**CAGCCATAGCTGCTCAG**CGAGGGCCTCAGGCCCA
26 27 28 29 30 31 32
GCCTTACTGCGCCCTCCGGCTTGC**CTCCGCCGGGGCGAGGGCAGGACCTGGGGCG**
33 34
GCCAGGGAAAGGGCAGTCGCGGGGAGGCAGTGCTAAAATTTGAGGAGGCTGCAG

б

СрG номер	Номер клону										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	■			■		■	■	■			
2	■			■		■	■	■			
3	■	■	■	■		■	■	■			■
4	■			■		■	■	■		■	
5	■	■		■		■	■	■			■
6	■			■		■	■	■			
7	■			■		■	■	■			
8	■			■		■	■	■			
9	■			■		■	■	■		■	
10	■			■		■	■	■			
11	■			■		■	■	■			
12	■	■		■		■	■	■			
13	■	■		■		■	■	■			
14	■			■		■	■	■			
15	■			■		■	■	■			
16	■			■		■	■	■			
17	■			■		■	■	■			

СрG номер	Номер клону										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18	■			■		■	■	■			
19	■			■		■	■	■			
20	■			■		■	■	■			
21	■			■		■	■	■			
22	■			■		■	■	■			
23	■			■		■	■	■			■
24	■			■		■	■	■			
25	■			■		■	■	■			
26	■			■		■	■	X			
27	■			■		■	■	X			
28	■			■		■	■	X			■
29	■			■		■	■	X			
30	■			■		■	■	X			
31	■			■		■	■	X			
32	■			■		■	■	X			
33	■			■		■	■	X		X	
34	■			■		■	■	X		X	

Рис. 3.12. Дані бісульфитного секвенування промоторного регіону *FGF12* зразка аденокарциноми ПЗ з СГ 9: а - послідовність секвенованого фрагменту з відміченими 34 СрG-динуклеотидами, праймерами (жирний шрифт) та NotI-сайтом – 7, 8; СрG-динуклеотиди (жирний підкреслений шрифт); б - дані бісульфитного секвенування 11 клонів досліджуваного зразка: ■ – метильовані СрG динуклеотиди, □ – неметильовані СрG -динуклеотиди, X – дані відсутні

3.2.2. Встановлення генетичних аберацій генів з високим відсотком змін за даними NotI-мікропанелей у епітелійних пухлинах. Гени, які за даними NotI –мікропанелей мали високий відсоток змін у пухлинах, але в яких не знайдено метилювання, вірогідно мають генетичні порушення. Для виявлення цих змін нами проведено пошук делецій методами втрати




гетерозиготності (LOH) та встановлення кількості копій гена. Ці методи дозволяють виявити як делеції, так і ампліфікації (дублікації) гена та/або локусу або регіону в залежності який тип маркерів використовувався для дослідження генетичних порушень [577, 580-583].

Для гена *NKIRAS1* встановлено кількість копій гена у 19 зразках пухлин нирки (табл. 3.9.) за допомогою кількісної ПЛР з референсним геном *TBP*.

Таблиця 3.9.

Результати дослідження кількості копій гена *NKIRAS1* у порівнянні з даними NotI-мікропанелей у пухлинах нирки

№ зразка	Стать	Вік	TNM	Стадія атипії	Дані NotI	кПЛР/ кількість копій
1	ж	52	T3N0M0	1	0,68	0,36
2	ч	46	T2N0M0	1	0,83	0,74
3	ж	57	T2N0M0	1	0,87	0,58
4	ч	57	T2N0M0	1	0,93	0,54
5	ж	68	T2N0M0	2	0,64	0,70
6	ж	51	T2N0M0	2	0,75	0,44
7	ч	60	T2N0M0	2	0,62	0,62
8	ж	36	T2N0M0	2	0,49	0,45
9	ж	66	T3N0M0	2	0,62	0,44
10	ж	60	T2N0M0	2	0,79	0,57
11	ч	66	T3N0M0	2	0,64	0,35
12	ч	55	T2N0M0	2	0,85	1,09
13	ж	38	T3N0M0	3	0,88	0,16
14	ч	65	T3N0M0	3	0,77	1,01
15	ч	56	T3N0M0	3	0,94	0,79
16	ч	46	T2N0M0	3	0,78	0,34
17	ж	60	T3N0M0	3	0,79	0,34
18	ч	60	T2N0M0	4	0,76	0,41
19	ж	61	T3N0M0	4	0,72	0,89

Примітки: 1 -  - гемізіготна делеція (>0,35, <0,85); 2-  - гомозиготна делеція (<0,35); 3 -  - без змін (>0,85) 2 копії гена

Виявлено 13 гемізіготних делецій та 3 гомозиготні делеції у пухлинах нирки. Це співпало з даними NotI-мікропанелей більш ніж на 80% для досліджуваних зразків пухлин. Слід зазначити, що в умовно-нормальних тканинах нирки не виявлено змін кількості копій гена *NKIRAS1* [577].




Отже, ген *NKIRAS1* має генетичні зміни, а саме делеції у пухлинах нирки, що підтверджує результати NotI-мікропанелей.

Дослідження кількості копій генів *PPM1M* та *PRICKLE2* (табл. 3.10) проведено на 18 зразках пухлин нирки та умовно-нормальних тканинах [582].

Таблиця 3.10.

Встановлення кількості копій генів *PPM1M* і *PRICKLE2* у пухлинах нирки

№ зразка	Стать	Вік	TNM	Стадія атипії	Кількість копій <i>PPM1M</i>	Кількість копій <i>PRICKLE2</i>
1	ч	38	T2NxM0	1	0,979	0,409
2	ч	47	T2NxM0	1	2,761	0,979
3	ж	43	T3N0M0	1	0,677	1,287
4	ч	48	T2NxM0	1	1,212	0,848
5	ж	46	T2NxM0	2	0,759	0,809
6	ж	46	T2NxM0	2	0,933	1,009
7	ч	41	T3NxM0	2	0,706	0,808
8	ч	50	T2NxM0	2	0,973	1,631
9	ж	45	T2NxM0	2	2,418	0,579
10	ж	66	T3NxM0	2	0,507	0,933
11	ч	68	T2NxM0	2	0,631	0,47
12	ч	48	T2NxM0	2	0,366	0,431
13	ч	45	T2NxM0	3	0,847	1,044
14	ч	67	T2NxM0	3	0,398	1,025
15	ч	46	T2N0M0	3	0,705	1,146
16	ж	61	T3N0M0	4	0,884	1,429
17	ч	51	T3N0M0	4	1,675	0,525
18	ч	62	T2NxM0	4	0,223	0,368

Примітки: 1-  - гемізіготна делеція (>0,35, <0,85); 2-  - гомозиготна делеція (<0,35); 3-  без змін (>0,85); 4 - жирним – ампліфікація (>1,5)

Аналіз результатів кількості копій гена методом кПЛР виявив наявність у пухлинах нирки 9 гемізіготних делецій як для гена *PPM1M*, так і для гена *PRICKLE2*. Крім того знайдено одну гомозиготну делецію гена *PPM1M*.

В умовно-нормальних тканинах нирки змін кількості копій генів не виявлено (дані не наведено). Крім делецій для обох генів знайдено випадки ампліфікацій у пухлинах нирки. Так, 3 ампліфікації встановлено для гена *PPM1M* та 1 ампліфікацію для гена *PRICKLE2*.

Наступними генами, для яких вивчено кількість копій генів та втрату гетерозиготності були гени родини *GPX*, які кодують селеновмісні протеїни (*GPX1-4, 6*). Але гени *GPX2* та *GPX6* не експресуються ні в пухлинах нирки, ні в нормальних тканинах нирки, тому їх дослідження ми не проводили. Ген *GPX1* єдиний з цього сімейства знаходиться на хромосомі 3 у регіоні 3p21.3, який є важливим для канцерогенезу епітелійних пухлин [590].

Вивчення метилювання промоторних ділянок вказаних генів не показало наявності епігенетичних порушень [580]. Також не виявлено й втрати гетерозиготності генів *GPX1* та *GPX3*. Аналіз кількості копій генів *GPXs* методом кПЛР проведено на 12 зразках пухлин нирки та УНТ (табл. 3.11).




Наявність показників кількості копій гена *GPX1* від 0,2 до 0,7 свідчить про наявність гомо- та гемізіготних делецій у 11 з 12 досліджених пухлин нирки (91,7%). Тоді як ген *GPX3* навпаки має інший тип генетичних порушень – ампліфікації. Про це свідчать показники кількості копій гена $>1,4$ (6 з 12 зразків пухлин нирки, що складає 50%). Ген *GPX4* не має зміни кількості копій гена. Наші експериментальні дані стосовно генетичних змін генів родини *GPXs* співпадають з результатами біоінформатичних веб ресурсів, таких як cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>), де зібрано дані мікрочипів, секвенування нового покоління (проекти TCGA, ICGC) [591-593]. Приклади результатів з цієї бази даних для низки досліджуваних генів наведено у додатку Д.

Отже, проведені дослідження на низці генів з пошуку генетичних змін у злоякісних пухлинах епітелійного походження підтверджують результати NotI-мікропанелей для генів *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPX1* стосовно наявності

Таблиця 3.11.

Встановлення кількості копій генів *GPX1*, *GPX3*, *GPX4* у пухлинах нирки

№ зразка	TNM	Стадія атипії	<i>GPX1</i>	<i>GPX3</i>	<i>GPX4</i>
1	T4NxMo	3	1,21	1,12	1,13
2	T2NxM1	3	0,42	1,40	1,10
3	T2NxM1	4	0,24	2,23	1,11
4	T2aNxM0	3	0,72	1,12	1,24
5	T2aNxM0	4	0,30	0,84	0,92
6	T4N0M0	3	0,43	1,50	1,14
7	T3bNxM0	2	0,71	0,92	1,11
8	T3bNxM0	2	0,73	0,91	1,02
9	T1bNxM0	2	0,41	1,03	0,91
10	T3N1M0	3	0,44	1,41	0,90
11	T3N0M0	3	0,32	1,53	1,04
12	T3N0M0	3	0,60	1,51	1,03

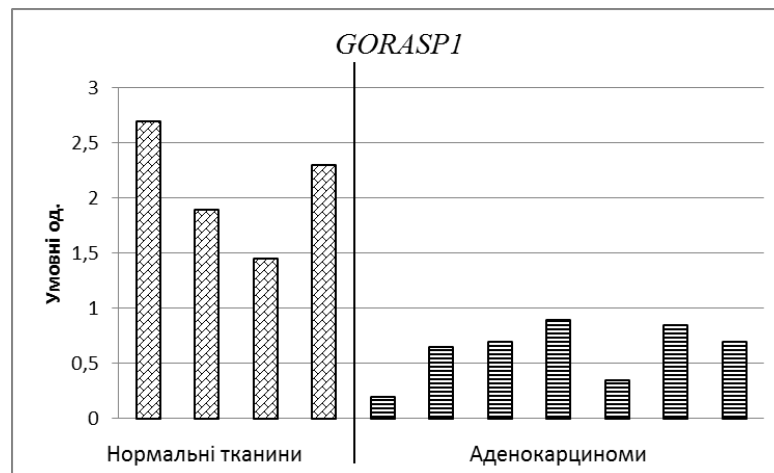
Примітки: 1-  - гемізіготна делеція (>0,35, <0,85); 2-  - гомозиготна делеція (<0,35); 3-  без змін (>0,85), 4 - жирним – ампліфікація (>1,5)

гомо- та гемізіготних делецій у пухлинах. Це свідчить про адекватність та точність методу скринінга для пошуку порушень у злоякісних пухлинах з метою виявлення як нових механізмів канцерогенезу, так і мішеней для фармакологічного впливу.

3.2.3. Аналіз експресії пухлино-асоційованих генів з високим відсотком генетичних та/або епігенетичних аберацій у епітелійних пухлинах за даними NotI –мікропанелей та відкритих баз даних. Після встановлення типу порушень (генетичних або епігенетичних) генів у пухлинах важливим показником є визначення рівня їхньої експресії для підтвердження результатів NotI-мікропанелей. Нами обрано низку генів у яких зафіксовано більше 45 % змін за даними NotI-мікропанелей для вивчення експресії методом нозерн-блотингу: *ITGA9*, *RARB*, *GORASP1*, *LRRC3B*, *NKIRAS1*, *GNAI2*, *ZIC4* [551]. Для нормалізації даних обрано ген *GAPDH*, оскільки з даних літератури відомо, що в нього відбуваються незначні зміни в експресії порівняно з b-

актином, який частіше використовують для вивчення відносної експресії у нормальних тканинах, але він має значні коливання експресії у пухлинах різного походження [594]. З зазначеного вище переліку генів вдалось отримати дані нозерн-блотингу відносної експресії для двох генів - *GORASP1* та *GNAI2* (рис. 3.13а, б).

a



б

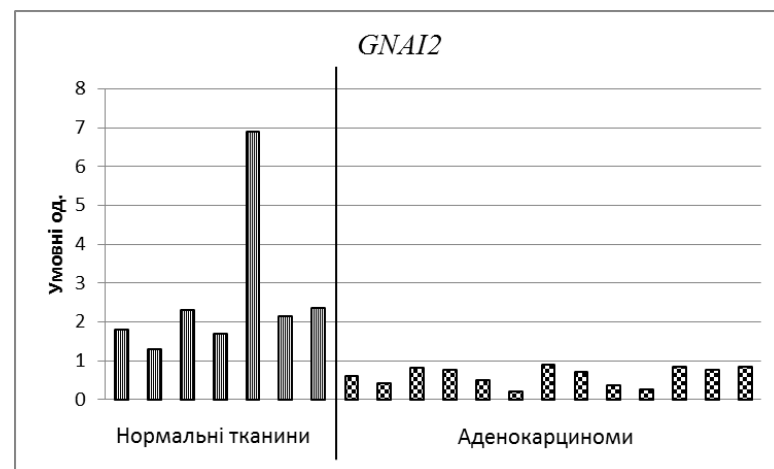


Рис. 3.13. Відносна експресія генів *GORASP1* (*a*) та *GNAI2* (*б*) за даними Нозерн-блот аналізу в умовно-нормальних зразках тканин яєчника та зразках аденокарцином яєчника

Отримані дані свідчать про те, що відносна експресія гена *GORASP1* (рис. 3.13а) знижується в аденокарциномах різних стадій у порівнянні з нормальними тканинами ($p < 0,05$). Вивчення методом нозерн-блотингу відносної експресії гена *GNAI2* (рис. 3.13б) вказує на зниження експресії в усіх

досліджуваних зразках злоякісних пухлин порівняно з умовно-нормальними тканинами ($p < 0,05$).

Ці результати корелюють з даними NotI-мікропанелей, які свідчать про значний відсоток (46,7) делецій та/або метилювання гена *GNAI2* у злоякісних пухлинах та суттєву частку (66,6%) делеції та/або метилювання гена *GORASP1* в аденокарциномах яєчника різних стадій, що могло бути причиною зниження рівнів експресії досліджуваних генів.

Для інших досліджуваних генів (*NKIRAS1*, *ZIC4*, *RARB*, *UBE2E2*, *LRRC3B*) не вдалось отримати сигналів нозерн-блот гібридизацій, що, напевно, пов'язано з досить низькою експресією згаданих генів як у нормальних тканинах, так і в пухлинах. Це не залежало від ступеня чутливості експериментів з нозерн-блот-гібридизацій, оскільки питома активність зондів у всіх гібридизаціях була в межах $5 \times 10^8 - 5 \times 10^9$ імп * хв⁻¹ хмкг⁻¹. Для отримання даних по експресії вищезгаданих генів необхідно проводити дослідження чутливішими методами, а саме – ПЛР у реальному часі.

Рівні відносної експресії (ВЕ) цілої низки генів встановлено у пухлинах нирки. Так, дослідження ВЕ гена *NKIRAS1* методом кПЛР проведено на 12 парах зразків пухлин нирки з різними стадіями захворювання (рис. 3.14).

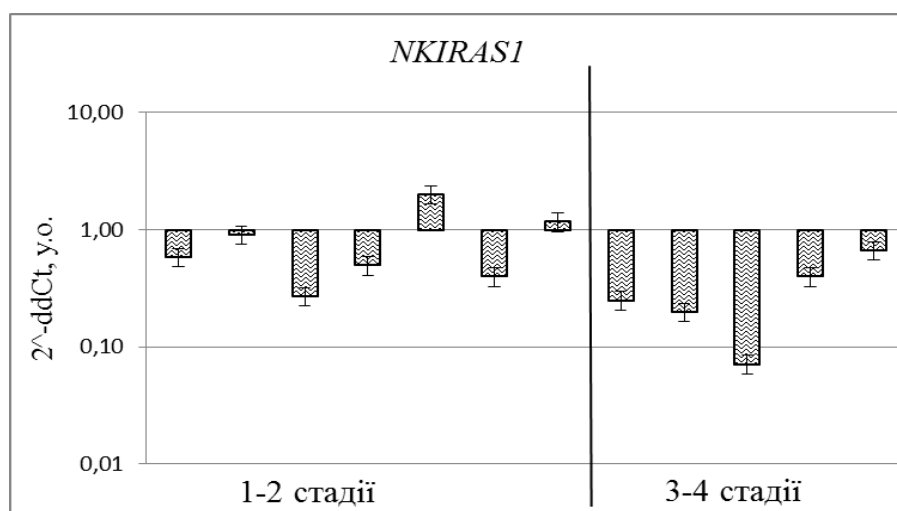


Рис. 3.14. Відносна експресія гена *NKIRAS1* у пухлинах нирки.

Значне зниження рівня ВЕ гена *NKIRAS1* спостерігалось у 75% зразків пухлин нирки (9 з 12, $p < 0,002$) порівняно з умовно-нормальною тканиною

[577]. Незважаючи на відсутність значущих кореляцій між рівнем експресії гена та статтю чи віком, слід зазначити, що експресія гена *NKIRAS1* має тенденцію до негативної кореляції з клінічними показниками пухлин ($r^s = -0,368$), яка може бути значущою при збільшенні кількості досліджуваних зразків. Так, пухлини 3-4 стадії мали нижчий рівень експресії гена *NKIRAS1*, ніж пухлини 1-2 стадії.

Встановлення рівнів ВЕ генів *GPX1* та *GPX3*, які показали наявність генетичних змін у пухлинах нирки, також проведено на 12 зразках пухлин та УНТ нирки (рис. 3.15). Експресію гена *GPX4* не вивчали, так як він не показав ні генетичних, ні епігенетичних порушень у досліджених пухлинах [580].

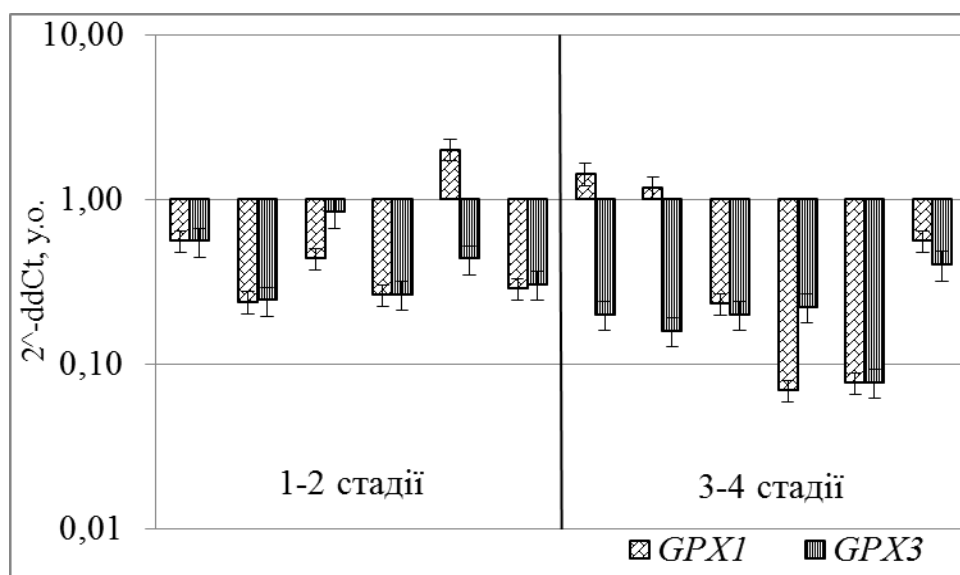


Рис. 3.15. Рівні ВЕ генів *GPX1* та *GPX3* у пухлинах нирки

Рівні ВЕ гена *GPX1* значно знижені у 9 з 12 зразків більш ніж у 2 рази ($p < 0,02$) у порівнянні з умовно-нормальною тканиною, що становить 75%. Відносна експресія гена *GPX3* була знижена у всіх зразках зразків пухлин нирки ($p < 0,01$) у порівнянні з навколишньою нормальною тканиною (100% зразків). Незважаючи на відсутність значущих кореляцій між рівнем експресії генів *GPX1* й *GPX3* та статтю чи віком, слід зазначити, що експресія генів має тенденцію до негативної кореляції з гістологічною оцінкою пухлин. Тобто зі збільшенням стадії, експресія генів *GPX1* та *GPX3* зменшується.

Наступні гени, для яких ми встановили рівні відносної експресії у пухлинах нирки, це *PPM1M* та *PRICKLE2* (рис. 3.16). Вони мали значні

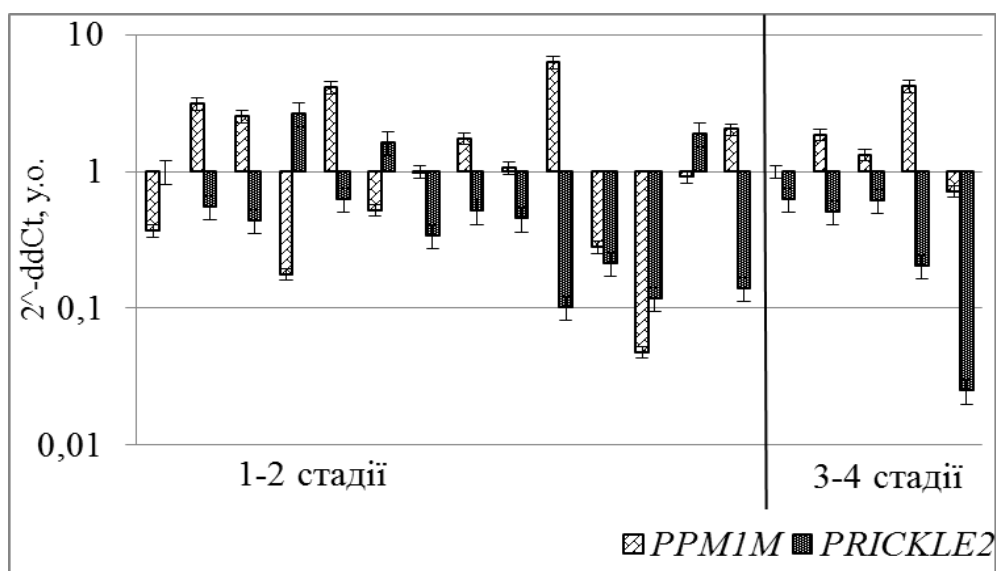


Рис. 3.16. Рівні ВЕ генів *PPM1M* та *PRICKLE2* у пухлинах нирки

генетичні та/або епігенетичні зміни за даними NotI-мікропанелей у пухлинах нирки та для яких підтверджено наявність генетичних змін за допомогою визначення кількості копій генів. Рівні ВЕ визначено у 19 зразках пухлин нирки 1-4 стадії захворювання та парних умовно-нормальних тканинах [581, 582].

Аналіз ВЕ гена *PPM1M* за допомогою кПЛР дозволив нам виявити зразки пухлин з трьома різними рівнями його експресії: знижена (більше, ніж у 2 рази), незмінна та підвищена (більше, ніж у 2 рази) експресія. Підвищена експресія гена *PPM1M* була виявлена у 50% зразків (9 з 18). Знижена експресія гена *PPM1M* спостерігалася у 33,3% (6 з 18) зразків. Так, у 16,7% випадків (3 з 18) статистично значущих змін експресії не виявлено. Інша картина спостерігалась при аналізі рівнів відносної експресії гена *PRICKLE2*.

У більшості зразків 15 з 18 рівні відносної експресії цього гена були знижені. Це становило 83% зразків пухлин. Жодних значущих кореляцій між експресією генів та віком, статтю або стадією атипії не спостерігалось ні для гена *PPM1M*, ні для гена *PRICKLE2*.

Ген *PRICKLE2* кодує білок, *prickle-like 2*, який є одним з основних білків Wnt-шляху, що визначає планарну полярність клітин (PCP). Він також бере участь у реконструкції цитоскелету, зміні клітинної адгезії та рухливості [595]. Наші дані свідчать про зниження ВЕ гена *PRICKLE2*. Це може впливати на

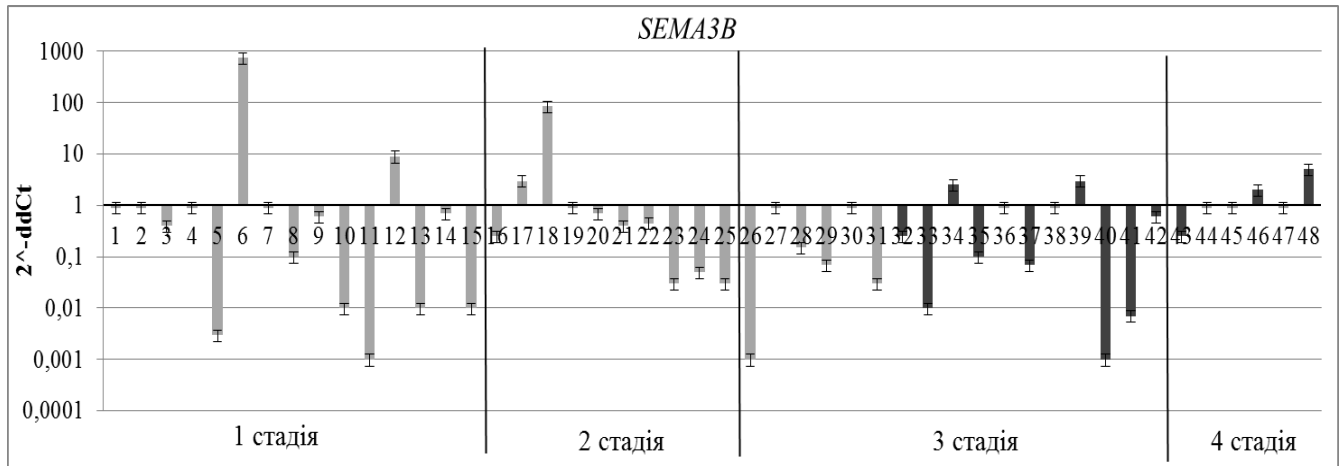
процеси дедиференціації та втрату типової морфології клітин при їхній злоякісній трансформації. Ген *PPM1M* кодує білок з фосфатазною активністю. Функція цього білка вивчалася лише у мишей. Проте відомо, що *ppm1m* бере участь у шляху індукції IL1 за допомогою NF-κB. Білок PPM1M дефосфорилує IκB, що блокує активацію NF-κB, запобігаючи індукції білків, пов'язаних з запаленням [596]. Тому підвищена експресія гена *PPM1M* може впливати на формування запалення, яке оточує новоутворення. Наші дані свідчать, що BE гена *PPM1M* в пухлинах нирки може бути як знижена, так і підвищена, що, ймовірно може означати різні способи блокування NF-κB у пухлинах.

Ген *SEMA3B* за даними наших досліджень має епігенетичні порушення, а саме метилювання промоторної ділянки у двох локалізаціях пухлин: нирки та легені [589]. Дослідження його експресії проводили на двох різних вибірках пухлин нирки та легені. Кількісна ПЛР була проведена на 48 пухлинах нирки (1-4 стадії захворювання) та УНТ. Результати розрахунків відносної експресії гена за моделлю 2^{-ddCt} наведені на рис. 3.17а. Паралельно були встановлені метилювання двох CpG-острівців та кількість копій гена (рис. 3.17б, в).

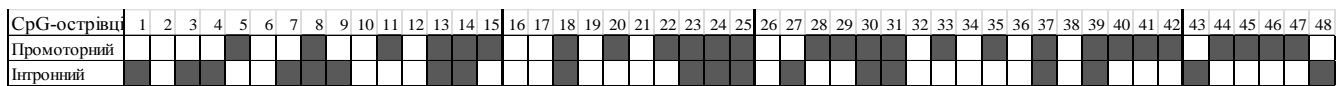
У 23 зразках пухлин спостерігається значне зниження BE гена *SEMA3B* (більше, ніж у 2 рази). У 8 зразках пухлин навпаки спостерігається значне підвищення експресії гена *SEMA3B* (більше, ніж у 2 рази). У 16 зразках пухлин нирки зміни експресії досліджуваного гена не виявлено. Кореляції між експресією та клініко-патологічними показниками не виявлено. Але вивчення кореляції між відносною експресією та генетичними/епігенетичними порушеннями гена *SEMA3B* на досліджуваній вибірці пухлин нирки має певні залежності.

З епігенетичних порушень вивчали метилюванням промоторного та інтронного CpG-острівців. Дослідження метилювання показало наявність метилювання у 27 зразках пухлин з 48 у промоторному CpG-острівці (56% зразків пухлин), та у 19 з 48 зразків пухлин у інтронному CpG-острівці (40% зразків) гена *SEMA3B*. Майже всі випадки метилювання промоторного острівця пов'язані зі зниженням експресії гена. Коефіцієнт кореляції Спірмена (r^s) між

а



б



в

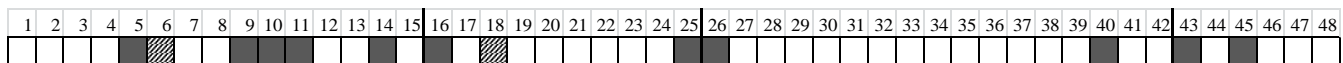


Рис. 3.17. Рівні відносної експресії гена *SEMA3B* у пухлинах нирки та генетичні та/або епігенетичні зміни: а - відносна експресія; б - статус метилювання двох СрG-острівців: ■ - метилювання; □ - без змін; в - кількість копій гена: ■ -гомо- та гемізіготні делеції; ▨ - ампліфікації; □ - без змін

експресією та метилюванням промоторного СрG-острівця складає 0,50 ($p < 0,01$), а інтронного СрG-острівця – 0,25 ($p < 0,01$). Тоді як кореляцій між експресією та кількістю копій гена *SEMA3B* не виявлено.

Отже, ці дані свідчать про те, що метилювання промотору гена *SEMA3B* є ймовірною причиною його інактивації у злоякісних новоутвореннях.

Дослідження ВЕ гена *SEMA3B* методом кПЛР проведено також на іншій вибірці – на 50 парах зразків пухлин нирки 1-4 стадії та УНТ [589]. Результати відносної експресії за 2^{-ddCt} моделлю наведені на рис. 3.18.

Результати аналізу показали наявність значного зниження експресії гена *SEMA3B* у пухлинах нирки в середньому у 4 рази в 42 з 50 зразків пухлин. Це становить 84% зразків пухлин нирки.

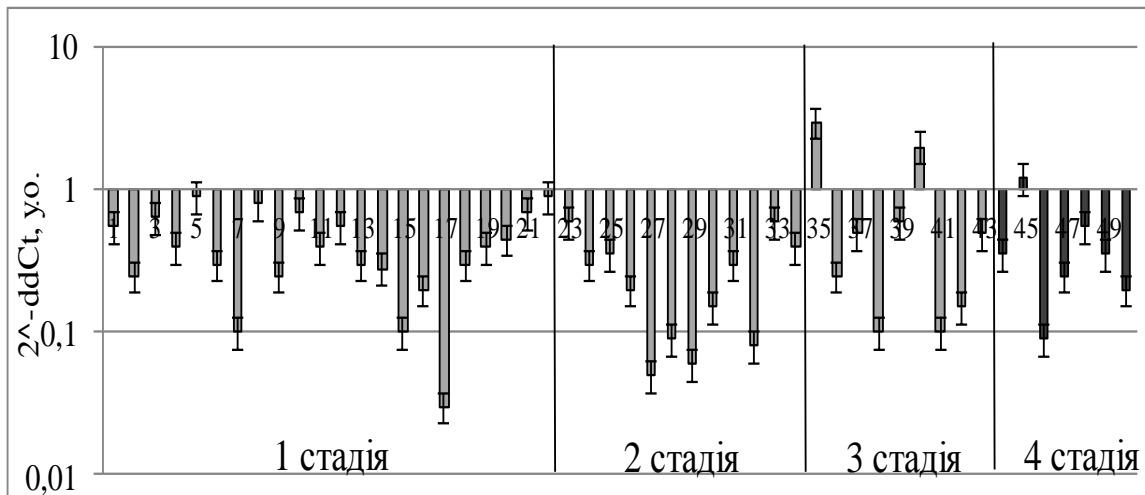


Рис. 3.18. Рівні відносної експресії гена *SEMA3B* у пухлинах нирки

Дослідження ВЕ гена *SEMA3B* (рис. 3.19) у двох основних гістологічних підтипах недрібноклітинного раку легені: аденокарциномах та плоскоклітинних карциномах (32 зразки пухлин та УНТ), виявило значне зниження експресії гена *SEMA3B* (від 2 до 300 разів) у 30 з 32 зразків пухлин легені, що

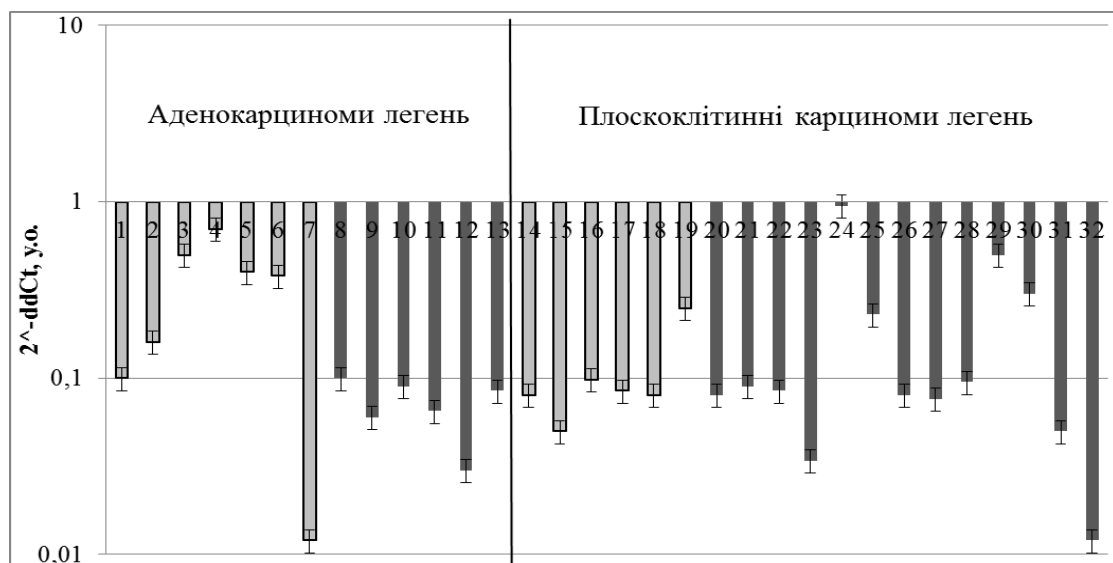


Рис. 3.19. Рівні відносної експресії гена *SEMA3B* у недрібноклітинних пухлинах легені за моделлю 2^{-ddCt} : світлосірі стовпчики – пухлини без метастазів; темносірі – пухлини з метастазами

становить 94% від усіх досліджених пухлин. Причому це зниження експресії гена *SEMA3B* притаманно обом підтипам раку легені, але середній рівень зниження його експресії у аденокарциномах складає 10 разів та 92% зразків, а в

плоскоклітинних карциномах - 14 разів та 95% зразків пухлин. Крім того є різниця експресії гена *SEMA3B* у пухлинах з метастазами та без них в обох підтипах.

Так у аденокарциномах з метастазами виявлено більш значне зниження експресії гена *SEMA3B* (19 разів), тоді як аденокарциноми без метастазів мали зниження його експресії у середньому лише у 3 рази ($p < 0,05$). У плоскоклітинних карциномах легені навпаки більш значне зниження експресії гена *SEMA3B* спостерігається на більш ранніх стадіях, де ще відсутні метастази. Проведення кореляційного аналізу за Спірменом не виявило значущих кореляцій між експресією гена *SEMA3B* у пухлинах нирки та легені та клініко-патологічними характеристиками пухлин [589].

Базуючись на результатах цих досліджень можна зробити наступні висновки про узгодження даних зі значного та значущого зниження експресії гена *SEMA3B* у пухлинах. Ці дані підтверджуються наявністю метилювання, як одного з механізмів пригнічення та інактивації експресії генів у канцерогенезі як взагалі, так і безпосередньо у пухлинах нирки та легені.

Наступні гени, які мали значущі порушення за даними NotI-мікропанелей, зокрема у пухлинах передміхурової залози, це гени *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9*. Рівні відносної експресії цих генів біли встановлені методом кПЛР у 11 парах зразків пухлин та УНТ передміхурової залози з різною сумою за шкалою Глісона та стадіями захворювання [554]. Результати аналізу рівнів BE усіх трьох генів за моделлю 2^{-ddCt} наведені на рис. 3.20. Вони свідчать, що усі досліджені гени мають середнє зниження BE приблизно 3 рази у пухлинах передміхурової залози ($p < 0,05$). Так, 5 з 11 зразків пухлин мають значуще зниження експресії усіх трьох генів одночасно. Отже, не залежно від характеру змін, виявлених за допомогою NotI-мікропанелей, спостерігається зниження рівнів експресії генів, які мають генетичні та/або епігенетичні порушення.

Отже, вивчення відносної експресії генів 3-ої хромосоми людини, що мають великий відсоток делецій та/або метилювання за даними NotI-мікропанелей та аналіз баз даних підтвердило значущі зниження експресії у

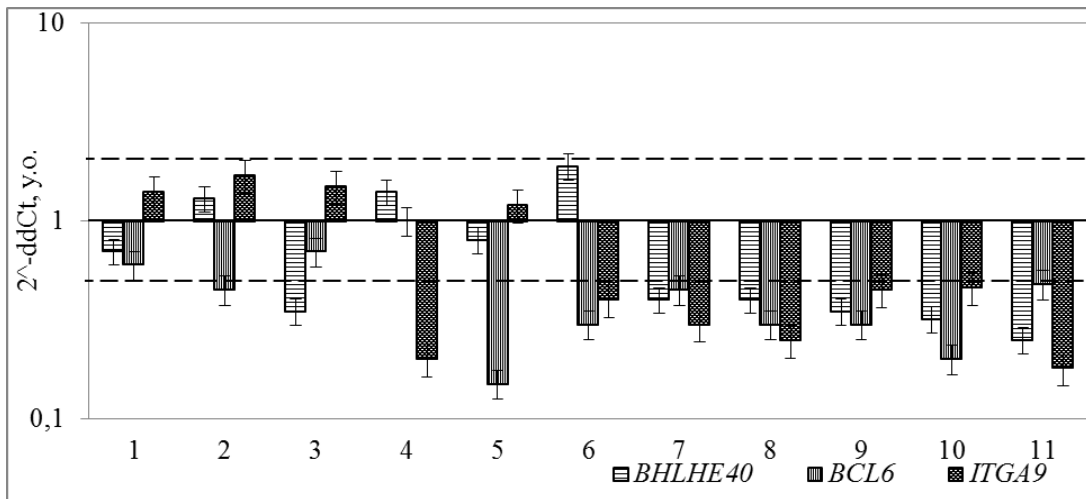
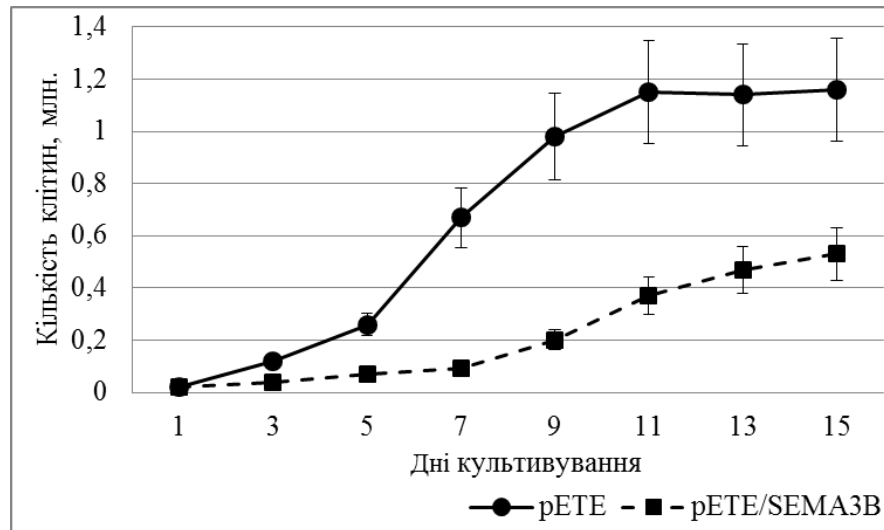


Рис. 3.20. Рівні відносної експресії генів *BHLHE40*, *BCL6* та *ITGA9* у зразках пухлин передміхурової залози. Пунктирні лінії – інтервал змін ВЕ більший, або менший ніж 2 рази

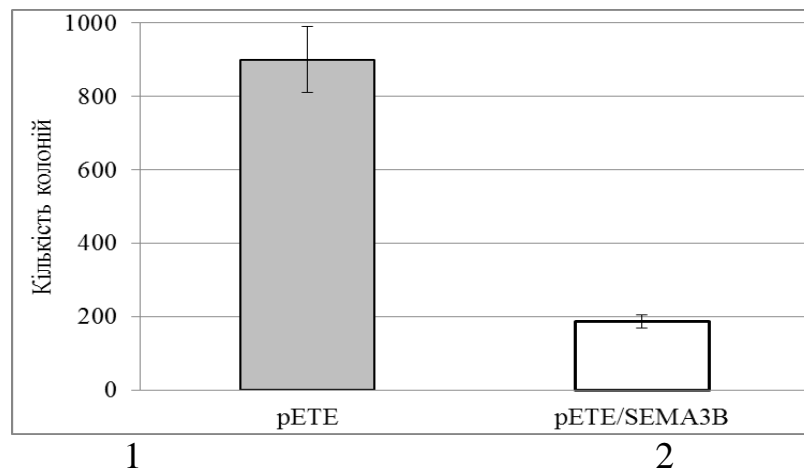
епітелійних пухлинах для генів: *GORASP1*, *GNAI2* – у пухлинах яєчника, *NKIRAS1*, *GPX1*, *GPX3*, *PPM1M*, *PRICKLE2* – у пухлинах нирки, *SEMA3B* – у пухлинах нирки та легені, *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* - у пухлинах передміхурової залози. Крім того, нами підтверджено іншими методами (МСП, бісульфітне секвенування) підвищення метилювання промоторів генів *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *SEMA3B*, *FGF12* та наявність генетичних порушень, а саме гомо- та гемізіготних делецій генів *NKIRAS1*, *GPX1*, *PPM1M1*, *PRICLE2* у епітелійних пухлинах.

3.2.4. Встановлення потенційної супресорної функції гена *SEMA3B* у пухлинах епітелійного походження *in vitro* та *in vivo*. Для встановлення можливої супресорної функції гена *SEMA3B* на ріст клітин пухлин ми провели спочатку експерименти *in vitro* (рис. 3.21) [589]. Клітинна лінія мілкоклітинного раку легені U2020 була трансфікована плазмідами рЕТЕ/*SEMA3B* або рЕТЕ у якості контролю. Трансфіковані клітини культивувались 15 діб. Показники швидкості росту клітин, результати тесту на формування колоній та показники проточної цитометрії з пропідум йодидом (PI-FACS-аналіз) наведено на рис. 3.21. Швидкість росту клітин U2020, які експресували *SEMA3B* була значно нижчою, ніж у контрольних клітин U2020 (рис. 3.21а) починаючи з 5-ї доби

а



б



в

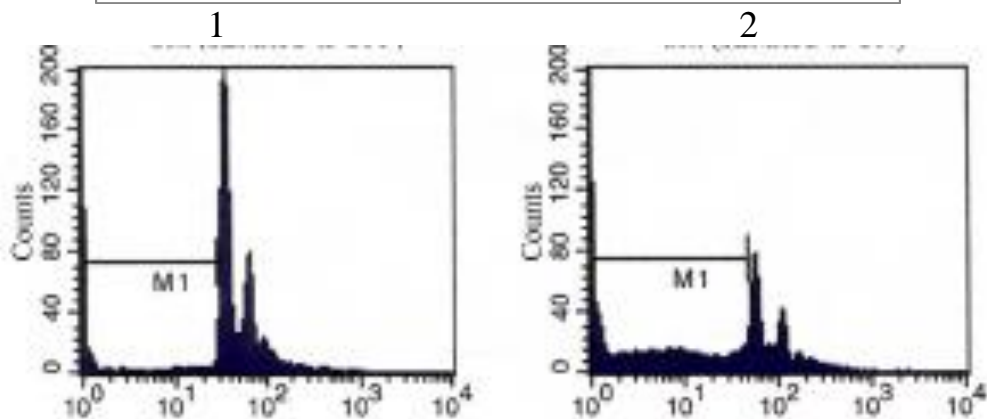


Рис. 3.21. *In vitro* культивування клітин U2020 (U7111 клон) в залежності від експресії *SEMA3B*: а – швидкість росту клітин U2020; б – тест на формування колоній; в – дані PI-FACS-аналізу: 1- з доксицикліном; 2 – без доксицикліна

культивування ($p < 0,01$). У кожному випадку показано середнє значення \pm стандартне відхилення з 4-х повторів.

Тест на формування колоній показав, що кількість колоній з U2020 клітин, які експресували *SEMA3B* була значно нижчою після зняття впливу супресивної дії доксицикліну на експресію *SEMA3B* (рис. 3.21б) та становила 890 ± 60 колоній у порівнянні з 190 ± 40 колоній для контрольних клітин U2020 ($p < 0,01$). За даними проточної цитометрії з пропідіум йодидом (рис.3.21в) виявлено значне збільшення апоптичних та некротичних клітин U2020, що експресували *SEMA3B* (без доксицикліну) (рис. 3.21в 1) у порівнянні з клітинами під впливом цього інгібітору експресії ((рис 3.21в 2) з $(7 \pm 2) \times 10^2$ до $(49 \pm 5) \times 10^2$ клітин ($p < 0,01$).

Отже, усі ці дані, отримані на моделі *in vitro* свідчать про те, що *SEMA3B* здатен інгібувати ріст клітин пухлин U2020, індукуючи в них апоптоз.

Наступним кроком було перевірити чи здатен *SEMA3B* проявляти супресорні властивості на ріст пухлин на моделі *in vivo* (рис. 3.22). Для цього була знову використана клітинна лінія U2020 з регульованою доксицикліном експресією гена *SEMA3B* у модельній системі *in vivo* на імунодефіцитних мишах. Чотири миші отримували доксициклін-вмісну воду (докс+ тісе, контрольні тварини), яка інгібувала експресію трансгена у U2020

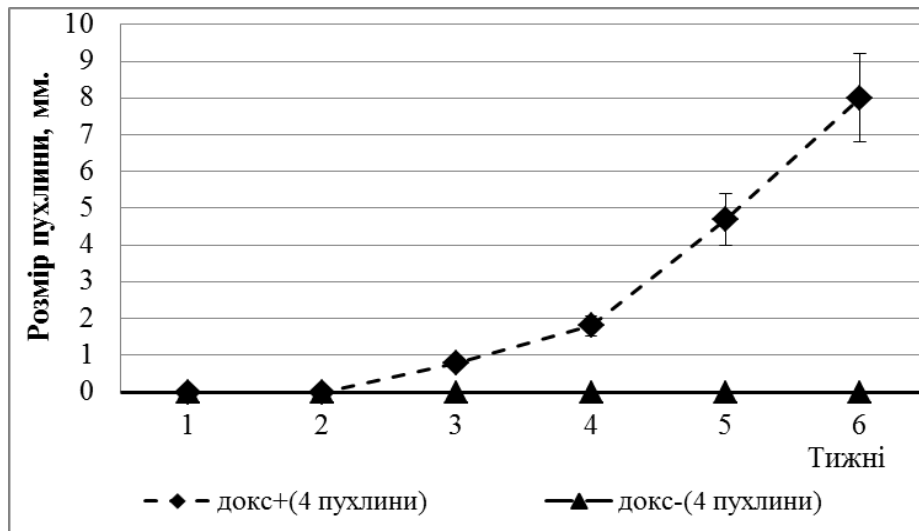


Рис. 3.22. Інгібування росту пухлин при експресії *SEMA3B*: докс+ - U2020 клітини без експресії *SEMA3B*; докс- - U2020 клітини з експресією *SEMA3B*

пухлинних клітинах. Чотири миші з введеними пухлинними клітинами з трансгеном не отримували доксициклін (докс- миші), тобто за цих умов ген *SEMA3B* активно експресувався у U2020 клітинах, що підтверджено за допомогою Нозерн-блот аналізу.

Дані розмірів пухлин з U2020, що спостерігались у імунодефіцитних мишах протягом 6-и тижнів наведено на рис. 3.22. Так, у мишей, які не отримували доксициклін та мали активну експресію гена *SEMA3B* не виявлено пухлин з U2020 клітин, тоді як у контрольних тварин, які отримували доксициклін, виявлено активний ріст пухлин, починаючи з 3-го тижня.

Гістологічне дослідження пухлин (які спостерігались за відсутності експресії *SEMA3B*) (рис. 3.23 а-г) підтвердило наявність ділянок активної проліферації клітин.

На препаратах коли експресія гена *SEMA3B* відсутня (рис. 3.23а) – спостерігаються поля заповнені еритроцитами (червоний сигнал). Жовтий сигнал виявляє колокалізацію зеленого та червоного сигналів (наявність кровоносних судин з клітинами крові). Синій сигнал – наявність ДНК. Рис. 3.23 б, г – тест TUNEL з ділянками апоптичних клітин (зелене забарвлення) особливо інтенсивні при експресії *SEMA3B* (рис. 3.23г).

Гістологічне дослідження тканин мишей, які були взяті з місць введення пухлинних клітин, при експресії трансгена, у цих тканинах спостерігались місця фіброзу, слабо диференційована строма та ділянки некрозу та апоптичні клітини (рис. 3.23г). Ці дані демонструють можливість супресії росту пухлин при активній експресії *SEMA3B* у імунодефіцитних мишах.

Дані експериментів як *in vivo*, так і *in vitro* свідчать про супресорну функцію гена *SEMA3B* на рост клітин пухлин епітелійного походження. Ці дані підтверджують результати інших дослідників щодо впливу гена *SEMA3B* на підвищення експресії p53 і p21 і інгібування фосфорилювання Akt (Ser473). Білок *SEMA3B* може індукувати затримку клітинного циклу на фазі G1/S [597].

Генетичні та/або епігенетичні порушення підтверджено зниженням експресії низки генів у епітелійних пухлинах: *GORASP1*, *GNAI2*, *NKIRAS1*,

GPX1, *GPX3*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *SEMA3B*, *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9*, що співпадає з даними NotI-мікропанелей.

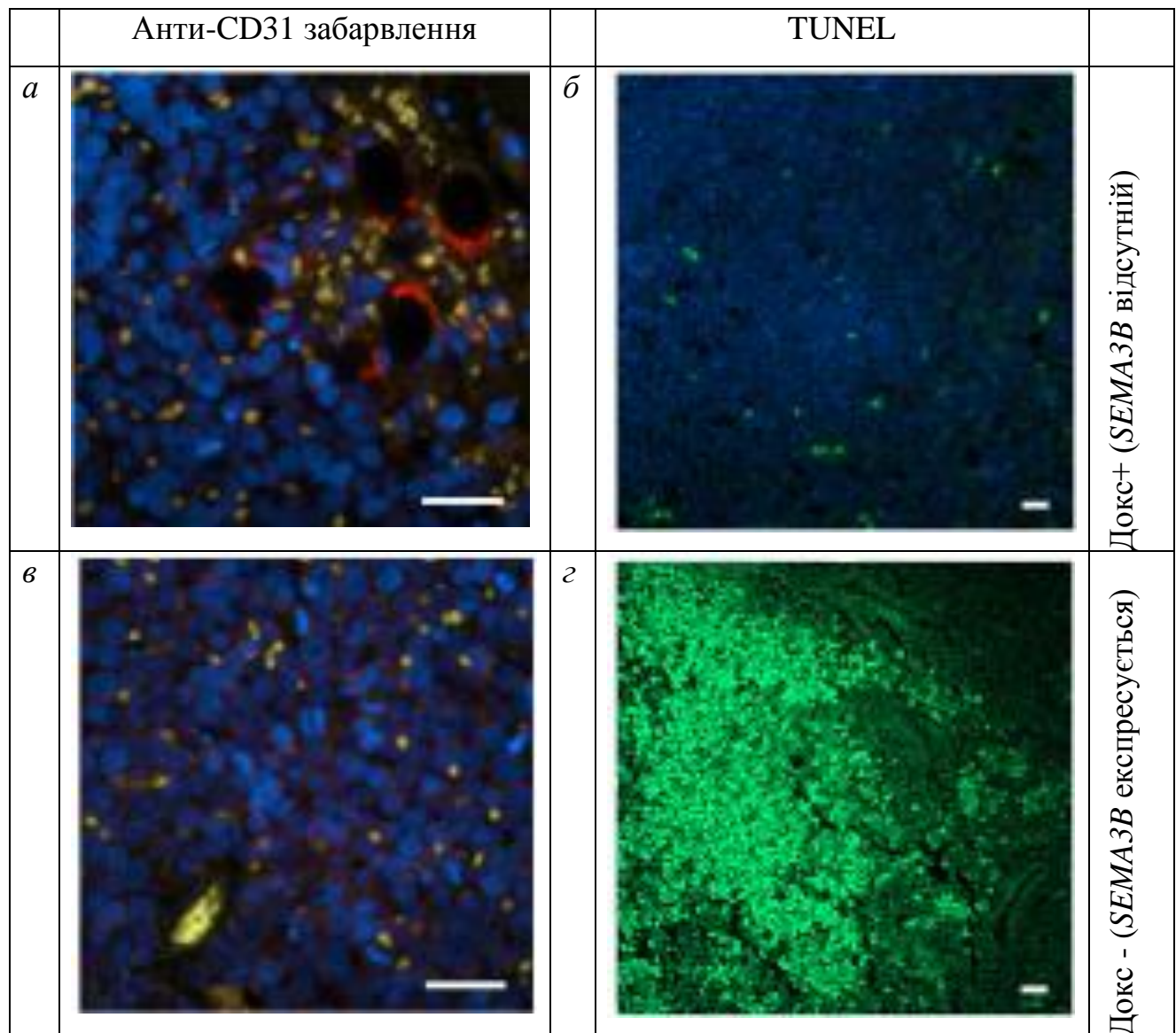


Рис. 3.23. Гістологічні препарати з пухлин імунодефіцитних мишей: *a*, *б* – експресія *SEMA3B* відсутня (при вживанні доксіцикліну мишами у питній воді); *в*, *г* - *SEMA3B* експресується (мишам не давали доксіциклін). *a*, *в* – забарвлення анти-CD31 для виявлення кровоносних судин (зелений сигнал)

Отже, нами підтверджена низка змін, виявлених у зразках епітелійних пухлин за допомогою NotI-мікропанелей, що мають епігенетичні зміни, а саме метилювання промоторів генів *ITGA9*, *LRRC3B*, *THRB*, *RBSP3*, *SEMA3B*, *GATA2*, *LMCD1*, *FGF12*.

Для низки генів нами виявлені гомо- та гемізиготні делеції у пухлинах: *NKIRAS1*, *PPM1M*, *PRICKLE2*, *GPX1*. Це свідчить про адекватність та точність методу скринінга для пошуку порушень у злоякісних пухлинах з метою виявлення як нових механізмів канцерогенезу, так і мішеней для фармакологічного впливу.

Вивчення відносної експресії генів 3-ої хромосоми людини, що мають великий відсоток делеції та/або метилювання за даними NotI-мікропанелей та баз даних підтвердило значущі зниження експресії у епітелійних пухлинах для генів: *GORASP1*, *GNAI2* – у пухлинах яєчника, *NKIRAS1*, *GPX1*, *GPX3*, *PPM1M*, *PRICKLE2* – у пухлинах нирки, *SEMA3B* – у пухлинах нирки та легені, *BHLHE40*, *BCL6*, *ITGA9* - у пухлинах передміхурової залози, що співпадає з даними NotI-мікропанелей.

Встановлено пухлино-супресорну функцію гена *SEMA3B* у системах *in vitro* та і *in vivo* на прикладі пухлин легені.

Роботи, опубліковані за матеріалами підрозділу: [551-556, 557-584].

3.3. Встановлення змін експресії пухлино-асоційованих генів при канцерогенезі раку передміхурової залози у модельній системі *in vitro* та валідація даних на зразках пухлин

Рак передміхурової залози є одним з найбільш часто діагностованих видів раку серед чоловіків у світі та має високий рівень смертності. Це дуже гетерогенний і складний тип раку [598, 599], враховуючи широкий спектр різноманітних генетичних, демографічних, екологічних факторів, особливостей стилю життя, що впливають на трансформацію клітин передміхурової залози, та механізми прогресії пухлин та метастазування [600-602].

Крім того, за результатами NotI-мікропанелей нами встановлено найбільшу кількість пухлино-специфічних порушень [555], що свідчить про особливі механізми розвитку та прогресії пухлин передміхурової залози.

Рецептор андрогенів (AR) та функціонування його шляху займає центральну роль у розвитку пухлин передміхурової залози [603]. Гіперактивація цього шляху є ключовим процесом у розвитку пухлин. Тому підходи андрогенної депривації ефективні для придушення прогресування раку передміхурової залози на цій стадії [604]. Але низка механізмів, синтез ендогенних андрогенів, мутації AR та поява про онкогенних ізоформ AR роблять пухлину незалежною від присутності зовнішніх андрогенів. Це призводить до невдачі лікування [605] та появи андроген нечутливих пухлин, які є більш агресивними. Більше того, деякі з пухлин можуть мати нейроендокринну диференціацію, що робить їх прогресію абсолютно незалежною від шляху AR [606]. У цих випадках на перший план виходять молекулярні та генетичні особливості пухлин, які надають раковим клітинам певні переваги у життєздатності, розмноженні та стійкості до хіміотерапії. Вибір терапії для людини залежить від цих факторів, але добре відомо, що різні терапії можуть працювати однаково ефективно. І навпаки, багато пацієнтів не пройдуть певного лікування, незважаючи на очевидно сприятливі характеристики хвороби [607]. Ефективність радикальної простатектомії для місцево прогресуючого раку передміхурової залози також є суперечливою і є предметом дискусії [608, 609]. Високо затребуваною для сучасної діагностики та високоефективного лікування є ідентифікація маркерів пухлинної агресивності та встановлення онкогенних особливостей клітин раку передміхурової залози [610, 611], як і стану мікрооточення пухлин, яке може сприяти прогресії та метастазуванню пухлин [612, 613].

3.3.1. Вивчення експресії пухлино-асоційованих генів у клітинних лініях раку передміхурової залози для виявлення особливостей канцерогенезу, підвищення агресивності та метастазування пухлин. Клітинні лінії раку передміхурової залози є класичною моделлю для вивчення особливостей канцерогенезу раку передміхурової залози [614]. Кожна модель має свої переваги та обмеження. Хоча дослідження відбуваються поза організмом та культивування клітин може вносити свій вплив на результати

експерименту. Адже якщо йдеться про специфічні генетичні, епігенетичні, транскриптомні, протеомні зміни саме у клітинах передміхурової залози – дослідження на клітинних лініях є найкращим вибором для вирішення цих завдань.

Клітинна лінія PNT2 – це клітини нормального епітелію передміхурової залози дорослої людини, які трансформовані геном SV40 та експресують великий Т-антиген [615]. Ця клітинна лінія є контролем та моделлю диференційованих нормальних епітелійних клітин передміхурової залози людини.

LNCaP – клітинна лінія аденокарциноми передміхурової залози людини, яка є андроген чутливою. Вона одержана з клітин аденокарциноми з метастазу лімфатичного вузла. У клітинах культури присутні високоафінні специфічні рецептори андрогенів у цитоплазмі і ядрі, крім того рецептори естрогенів виявлені в цитоплазмі клітин культури [616]. Вона експресує Простато-Специфічний Антиген (PSA) та Людську кислу фосфатазу передміхурової залози (hPAP) (<http://www.lncap.com/>). Клітинна лінія LNCaP є моделлю для вивчення транскрипційної регуляції в генах передміхурової залози завдяки простато-специфічним андроген-залежним процесам.

Клітинні лінії DU145 та PC3 одержані з агресивних раків передміхурової залози [617]. Клітинна лінія DU145 є гормонезалежною та не експресує простатоспецифічний антиген (PSA). Пухлини з клітинної лінії DU145 одержані з метастазів у мозок. Вони виявляють у мишей середній потенціал до метастазування, тоді як клітинна лінія PC3 є високо метастатичною [618].

Отже, в наших дослідження використано андроген-чутливі та андроген-нечутливі клітинні лінії та клітинну лінію нормального епітелію передміхурової залози.

Нами вивчено рівні BE у 4-х клітинних лініях ПЗ 65 генів, які належать до різних сигнальних шляхів (табл. 3.12).

Гени, що вивчалися, належать до таких функціональних груп: цитокіни та хемокіни (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6*), інтерлейкіни та рецептори до них (*IL6*, *IL8*,

Таблиця 3.12.

Сигнальні шляхи, до яких відносяться досліджувані гени

Сигнальний шлях	Гени
Wnt канонічний шлях	<i>FAT1, WNT7A, TCF7L2, KIAA1199, SUFU</i>
Wnt неканонічний шлях	<i>RHOA, PLCB1, MYO1B</i>
NF-κB шлях (Ядерний фактор κ – енхансеру легкого ланцюга активованих В-клітин)	<i>IL8(активація шляху), CXCL2, TNFRSF11B, S100A4, IL1B, IL6, IL1RL1</i>
<i>TP53</i> шлях	<i>CCNB2, CCNE1, TAGLN, P16, SOX4, TSC2</i>
Системи міжклітинного матриксу та адгезії (АДГ): адгезія клітин	<i>CDH1, CDH2, GLCE, PLOD2</i>
АДГ: β-1-інтегрин- взаємодія поверхні клітин	<i>CSPG4</i>
АДГ: сигналінг ефринів:	<i>EFNA, FYN, MYO10</i>
АДГ: фокальна адгезія	<i>THBS4, MXRA5, SPP1, ACTA2, ACTB, RHOF</i>
АДГ: сигналінг відштовхування шляхом інгібування адгезії інтегрину	<i>SEMA3A, PLXNA, CDK5, ACTA2, FYN</i>
Сигнальна трансдукція	<i>RASSF4, AGTR1, KCNJ2, KCNJ4, IL33, CAV1, PKM2, NR5A2</i>
Транскрипційні фактори	<i>HOXA13, PAX8, SOX4</i>
Інвазивність та метастазування	<i>SERPINE1, SERPINE2B, PLAUG, S100A4, SERPINE2A</i>
Ангіогенез	<i>DCN, IL8, MME, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCR2, PREX1, PLCB1</i>
Контроль клітинного циклу, апоптоз та репарація ДНК	<i>PCNA, KI67, CCNB2, CCNE1, P16, RNASET2, TERT, HBEGF, P27</i>
Метаболізм триптофану	<i>TPH1</i>

IL1B, IL1RL1), транскрипційні фактори (*HOXA13, PAX8, SOX4*), ядерні рецептори (*NR5A2*); гени, що кодують протеїни мембранних каналів (*KCNJ2, KCNJ4*), кінази (*FYN, CDK5*), серпінові інгібітори пептидаз (*SERPINE1, SERPINE2A, SERPINE2B*) та інші. Дані відносної експресії генів у клітинних лініях передміхурової залози представлено в табл. 3.13.

Аналіз BE 65 генів у клітинних лініях ПЗ, показав, що 35 генів мають зміни BE більше, ніж у 4 рази у клітинних лініях раку ПЗ у порівнянні з нормальною клітинною лінією PNT2 [619]. Для 26 генів – рівні BE знижуються, а для 7 генів – підвищуються у клітинних лініях раку передміхурової залози.

Таблиця 3.13.

Зміни ВЕ у клітинних лініях LNCaP, DU145 та PC3 раку ПЗ

Шляхи	Гени	Клітинні лінії					
		Підвищення експресії			Зниження експресії		
		LNCaP	DU145	PC3	LNCaP	DU145	PC3
1	2	3	4	5	6	7	8
Wnt-шлях	<i>TCF7L2</i>	0	0	0	4,2	0	0
	<i>FAT1</i>	0	0	0	4,6	0	0
	<i>WNT7A*</i>	0	0	0	69,6*	44,6*	0
	<i>SUFU</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>MYO1B</i>	0	0	0	51,4	0	15,5
NF-κB	<i>IL1b</i>	21	0	445,7	0	15,4*	0
	<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	0	0	0
	<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	0	0	0
	<i>S100A4</i>	23,6	17,8	0	0	0	0
	<i>TNFRSF11B*</i>	0	0	0	11489,3*	35,9*	15,8
	<i>IL6</i>	0	0	0	0	0	44,8
	<i>IL1RL1*</i>	0	0	15,1	1016,2*	468,2*	0
	<i>IL33</i>	0	x	0	0	x	0
p53	<i>TAGLN</i>	0	0	0	4,5	0	10
	<i>CCNB2</i>	0	0	0	107,7	0	0
	<i>CCNE1</i>	0	0	0	4,1	0	11,5
	<i>P16</i>	0	4,3	0	0	0	0
	<i>SOX4</i>	0	0	0	5,2	0	0
	<i>TSC2</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>CDH1*</i>	0	0	0	1530,7*	0	3145,3*
Міжклітинний матрикс та клітинна адгезія	<i>CDH2</i>	0	x	0	0	x	0
	<i>GLCE</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>CSPG4*</i>	0	0	0	4,9	71,0*	6864,8*
	<i>EFNA5</i>	0	0	0	32,2	0	6
	<i>FYN</i>	0	0	0	18,8	6,4	0
	<i>MYO10</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>CDK5</i>	0	0	0	27	0	0
	<i>SEMA3A*</i>	0	0	0	0	75,5*	0
	<i>PKM2</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>RHOF</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>AGTR1</i>	x	x	x	x	x	x
	<i>MXRA5</i>	x	x	x	x	x	x
	<i>CAVI</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>ACTB</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>PLOD2</i>	0	0	0	0	0	0

Продовж. табл. 3.13.

1	2	3	4	5	6	7	8
Сигнальна трансдукція та транскрипційні фактори	<i>RASSF4</i>	0	0	0	12,8	5,3	0
	<i>HOXA13</i>	0	0	7,4	0	0	0
	<i>NR5A2</i> *	0	0	0	13,6	0	28,6*
Інвазивність та метастазування	<i>SERPINE1</i> *	0	0	0	7,7	373,3*	0
	<i>PLAU</i>	0	0	0	15,2	7,7	0
	<i>SERPINE2b</i> *	0	0	x	7,3	424,0*	x
	<i>S100A4</i>	23,6	17,8	0	0	0	0
	<i>SERPINE2a</i>	0	0	0	9,1	7,6	0
Ангіогенез	<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	0	0	0
	<i>MME</i> *	0	0	0	6,1	4179,2*	18
	<i>CXCL1</i>	0	0	0	116,3	16	10
	<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	0	0	0
	<i>CXCL6</i> *	0	0	0	142,0*	4,1*	0
Контроль клітинного циклу та репарація ДНК	<i>PCNA</i>	0	0	0	4,7	0	0
	<i>Ki67</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>HBEGF</i> *	0	0	0	413,9*	28,1*	15,5*
	<i>P27</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>CCNB2</i>	0	0	0	107,7	0	0
	<i>CCNE1</i>	0	0	0	4,1	0	11,5
	<i>P16</i>	0	4,3	0	0	0	0
	<i>RNASET2</i>	0	0	0	0	0	0

Примітки: 1. «0» – зміни експресії менше, ніж у 4 рази; 2. «*» – слабо-експресовані гени в дослідних клітинних лініях ($Ct > 30$); 3. «x» – відсутність експресії генів

Два гени мали перемінний рівень BE у клітинних лініях раку ПЗ порівняно з експресією генів у клітинній лінії PNT2. П'ятнадцять генів, які мають дуже низький рівень BE, з пороговим циклом (Ct) більше, ніж 30 у клітинній лінії PNT2 в табл. 3.13 не розглядаються в зв'язку з неможливістю отримання статистично значущих результатів.

У класичному шляху Wnt з восьми генів, які вивчались, рівень BE знижується для чотирьох генів (*WNT7A* – в клітинних лініях LNCaP, DU145; *TCF7L2*, *FAT1* – в клітинній лінії LNCaP; *MYO1B* – в клітинних лініях LNCaP,

PC3) та не змінюється експресія гена *SUFU*. Ген *WNT7A* кодує один з Wnt білків, які, зв'язуючись з рецепторами на поверхні клітин, стабілізує цитоплазматичний β -катенін, що може активувати транскрипційні фактори родини LEF/TCF, до яких входить *TCF7L2*. На пухлинах світлоклітинної карциноми нирки показано, що рівень експресії гена *WNT7A* знижується [315]. Ген *TCF7L2* може репресувати транскрипцію генів, залежних від AR у пухлинах молочної залози, що робить його цікавим об'єктом для досліджень і в андроген-чутливих пухлинах ПЗ [620]. Ген *FAT1* кодує трансмембранний протокадгерин. Відмічено його здатність інгібувати сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну за рахунок зв'язування з β -катеніном в гліобластомах, пухлинах товстого кишечника, а також пухлинах шиї та голови [621].

Окрім канонічного шляху Wnt, існує шлях планарної клітинної полярності (Planar Cell Polarity), який відповідає за правильну поляризацію клітин при формуванні структури тканини. Ген *MYO1B* кодує міозин 1 В, який регулюється Rho-протеїнами та забезпечує клітинну міграцію. Спираючись на отримані дані, можна припустити інгібування класичного Wnt шляху в клітинній лінії LNCaP, отриманої з не агресивної пухлини, що підтверджується даними інших дослідників [622].

Серед генів шляху NF- κ B два гени (*TNFRSF11B* — в усіх лініях, *IL6* - в LNCaP) виявили знижений рівень BE, три гени (*IL8* — в клітинних лініях DU145, PC3; *CXCL2* - в DU145; *S100A4* – в клітинних лініях LNCaP, DU145) — підвищений рівень BE, а два гени експресуються по-різному у досліджуваних клітинних лініях, так у клітинних лініях LNCaP та DU145 *IL1RL1* – в має знижені рівні BE, а у PC3 – навпаки має підвищений рівень BE. *IL1b* — у клітинних лініях LNCaP та PC3 має підвищення BE, тоді як у DU145 – знижений рівень BE. Досліджувані гени шляху NF- κ B виконують різні клітинні функції. Ген *IL1RL1* кодує інтерлейкін-подібний рецептор 1 та належить до родини Toll-like рецепторів [623]. Гени *IL8* та *IL1B* кодують інтерлейкін 8 та інтерлейкін 1-бета, що, навпаки, активують NF- κ B шлях. Інтерлейкін 8 - цитокін запалення, який є одним з важливих медіаторів переходу від андроген-

чутливого до андроген-нечутливого раку ПЗ. Його інгібування викликає зупинку клітинного циклу та апоптоз в клітинних лініях DU145, PC3 [624]. Ген *CXCL2* кодує хемокин, який є транскрипційною мішенню для шляху NF-кВ, і, в свою чергу, викликає зміни в регуляції генів. Інгібування його експресії призводить до зниження проліферації та активації апоптозу у пухлинних клітинах [625]. Ген *S100A4* кодує кальцій-зв'язуючий білок, який приймає участь у регуляції клітинного циклу, диференціації та є одним з білків ЕМП. Він є позитивним регулятором шляху NF-кВ [626]. Аналіз отриманих даних рівнів експресії генів цього шляху у клітинних лініях раку передміхурової залози, не дає можливості однозначно виявити його активацію або інгібування. Активаторні механізми працюють паралельно з інгібіторними. Це пояснюється певною мірою складною організацією пухлин.

Так, поряд з підвищенням активності цитокінів запалення відбуваються процеси некрозу у пухлинах.

Серед генів шляху p53 виявлено зниження рівня експресії чотирьох генів: *CCNE1*, *TAGLN* — у клітинних лініях LNCaP та PC3; *CCNB2*, *SOX4* – у клітинній лінії LNCaP, підвищення рівня BE одного гена *P16* у клітинній лінії DU145, тоді як рівень BE гена *TSC2* взагалі не змінювався. Аналіз експресії генів цього шляху вказує на переважне інгібування p53-залежного апоптозу в клітинних лініях LNCaP та PC3.

З двадцяти генів клітинної адгезії у шести виявлено знижені рівні BE. *CSPG4* має знижений рівень BE в усіх клітинних лініях. Інші п'ять генів – у окремих клітинних лініях. Так, *CDH1*, *EFNA5*, мають знижені рівні BE в клітинних лініях LNCaP та PC3, *SEMA3A* - у DU145; *CDK5* — у LNCaP; *FYN* - у клітинних лініях LNCaP та DU145). Сім генів (*GLCE*, *MYO10*, *PKM2*, *RHOF*, *CAV1*, *ACTB*, *PLOD2*) мають не змінні рівні BE у досліджуваних клітинних лініях. Ген *CDH1* кодує кадгерин 1 (E-кадгерин). Він є маркером епітелійних клітин, і зниження його експресії асоціюють з активацією ЕМП, який супроводжує розвиток пухлин та підвищення їхньої злоякісності [627]. Система клітинної адгезії включає сигнальний шлях β -1-інтегрину, що контролює

взаємодію між клітинами. До цього шляху також належить хондроїтину сульфат протеоглікан 4, який кодується геном *CSPG4*. Інгибування його експресії знижує лімфоангіогенез та неоваскуляризацію в ксенографтних пухлинах ПЗ [628]. Для клітинної адгезії також важливим є сигналінг ефринів. Рецептори ефринів – це родина рецепторів тирозинових кіназ, які є важливими для клітинної міграції, відштовхування та адгезії. Ген *EFNA5* кодує ефрин 5, що є лігандом рецептору тирозинових кіназ. Знайдено зниження рівня його експресії в пухлинах молочної залози [629], тоді як в інших типах пухлин він мало вивчений. Загальне зниження експресії генів, що кодують білки клітинної адгезії, свідчить про втрату нормальних міжклітинних взаємодій.

Відповідний баланс між процесами адгезії та відштовхування клітин, які є дуже важливими для морфогенезу клітин протягом ЕМП та метастазування пухлин набувається завдяки відомим парам «ліганд-рецепторних» взаємодій, серед яких семафорин-плексин, які контролюють цей баланс [630]. Ген *SEMA3A* кодує секретований семафорин III, який діє як супресор росту пухлин та інгібує клітинну міграцію та ангіогенез. Його експресія зазвичай знижена у пухлинах [631]. Ген *CDK5* кодує циклін-залежну кіназу 5, яка впливає на полімеризацію та динаміку актину та на клітинну міграцію. Експресія активатора цієї кінази (p35) знайдена в агресивних клітинних лініях ПЗ та в клінічних зразках із метастазами [632]. Зниження експресії семафорину в клітинній лінії DU145 свідчить про активізацію міграції та можливу втрату адгезії клітин.

З семи генів системи сигнальної трансдукції клітин та транскрипційних факторів один ген мав підвищений рівень експресії (*HOXA13* — в PC3), два - знижений (*RASSF4* – в LNCaP, DU145; *NR5A2* - в LNCaP, PC3).

Змін експресії зазнають і гени, які кодують транскрипційні фактори. Серед них гени *HOXA13* та *NR5A2*. Показано, що виживаність пацієнтів, хворих на карциному стравоходу, нижча при високому рівні експресії гена *HOXA13* [633]. Рівень експресії гена *NR5A2* підвищений у 45% карцином молочної залози та корелює з експресією рецептора естрогенів [634]. Проте роль цих транскрипційних факторів у формуванні пухлин ПЗ маловідома.

Дослідження VE генів, що асоційовані з процесами інвазивності та метастазування показало зниження рівнів експресії для чотирьох генів: *PLAU*, *SERPINE1*, *SERPINE2a* - в LNCaP, DU145; *SERPINE2b* – в усіх лініях. Підвищення VE спостерігалось для гена *S100A4* у клітинних лініях LNCaP та DU145. Гени, що відносяться до цієї групи виконують низку важливих клітинних функцій як у нормі, так і при розвитку пухлин. За даними літератури, в більш агресивних клітинних лініях DU145 та PC3 відбувається зниження експресії гена *SERPINE1*, та підвищення експресії гена *PLAU*, в порівнянні з лініями клітин PrEC та LNCaP [635]. В нашому дослідженні виявлено зниження експресії інгібіторів урокінази (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*), що може свідчити про активізацію інвазивних властивостей клітин та посилення метастатичних характеристик. Експресія на *PLAU* в клітинних лініях LNCaP, DU145 знижена, а в лінії клітин PC3 – не змінюється.

З досліджуваних генів, що приймають участь у ангиогенезі, підвищення VE спостерігається для двох генів: *IL8* у клітинних лініях DU145 та PC3, а для гена *CXCL2* лише у лінії DU145. Зниження VE виявлено для трьох генів: *MME*, *CXCL1* в усіх лініях; *CXCL6* лише у клітинних лініях LNCaP та DU145. Так, ген *MME* кодує мембранну метало-ендопептидазу, яка бере участь у деградації фізіологічно активних пептидів (брадикінін, оксітоцин, нейротензин та інш.), що робить неможливим їхнє подальше зв'язування з рецептором андрогенів та інгібується подальший розвиток агресивних метастазуючих пухлин ПЗ. За даними досліджень на лініях клітин ПЗ показано відсутність експресії *MME* в клітинах лінії PC3 та значна експресія у клітинах лінії LNCaP [636]. Проте в нашому дослідженні зниження рівня експресії гена *MME* відбувається у всіх трьох лініях раку ПЗ, і найбільше зниження саме в лініях, отриманих з агресивних пухлин. Гени *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6* кодують відповідні хемокіни, які є проангіогенними факторами та медіаторами запалення, а підвищення їхньої експресії характерно для багатьох пухлин, включаючи рак ПЗ [637].

Дослідження VE низки генів системи клітинної проліферації та репарації показало підвищення експресії гена *P16* у клітинній лінії DU145. Тоді як

зниження BE виявлено для чотирьох генів: *PCNA*, *CCNB2* у клітинній лінії LNCaP; для *CCNE1* зниження BE спостерігалось у LNCaP та PC3; тоді як для гена *HBEGF* зниження BE виявлено в усіх трьох клітинних лініях. В клітинній лінії LNCaP експресія гена *PCNA* викликана взаємодією з AR [638]. Проте в цьому дослідженні експресія гена *PCNA* знижується в клітинній лінії LNCaP, що може свідчити про зниження експресії AR.

На підставі встановлених рівнів BE генів нами були вибрано низку генів, які диференційно експресуються в андроген-чутливих та андроген-нечутливих клітинних лініях, що відрізняються ступенем агресивності (табл 3.14). Відібрані гени відносяться до процесів ангиогенезу, інвазивності та метастазування, контролю клітинного циклу. Вони можуть бути основою для подальших досліджень та розробки наборів маркерів для діагностики агресивного раку ПЗ. Для них за даними літератури була перевірена наявність секретованого білку (табл. 3.14), як одного з факторів важливих для діагностичних цілей.

Таблиця 3.14.

Диференційно-експресовані гени у клітинних лініях передміхурової залози з різним ступенем агресивності

Підвищення експресії					Зниження експресії				
Гени	Клітинні лінії			Секреція білка	Гени	Клітинні лінії			Секреція білка
	LNCaP	DU145	PC3			LNCaP	DU145	PC3	
<i>IL8</i>	0	4,8	5,8	+	<i>MME*</i>	6,1	4179,2*	18	-
<i>CXCL2</i>	0	4,5	0	+	<i>IL6</i>	0	0	44,8	+
<i>P16</i>	0	4,3	0	-	<i>CXCL1</i>	116,3	16	10	+
<i>HOXA13</i>	0	0	7,4	-	<i>SERPINE2b</i>	7,3	424,0*	x	+
<i>IL1RL1</i>	0	0	15,1	-	<i>CCNE1</i>	4,1	0	11,5	-
<i>IL1B</i>	21	0	445,7	+	<i>TAGLN</i>	4,5	0	10	-
					<i>IL1B</i>	0	15,4*	0	+

Примітки: 1. “0” - зміни експресії менше 4-х разів; 2. “*” - низько-експресовані гени в дослідних клітинних лініях (Ct>30); 3. “x” – відсутність експресії

Отже, з 65 досліджуваних генів знайдено зміни експресії для 29 генів в клітинній лінії LNCaP, для 20 генів — в клітинній лінії DU145 та для 16 генів — в клітинній лінії PC3. В клітинній лінії LNCaP простежується інгібування класичного Wnt шляху. В клітинних лініях LNCaP та PC3 виявлено інгібування p53 опосередкованого апоптозу. Зниження експресії гена *SEMA3A* може свідчити про активізацію сигнальних шляхів, контролюючих міграцію клітин. В усіх лініях раку ПЗ простежуються ознаки підсилення ЕМП, який проявляється у зниженні рівня експресії генів клітинної адгезії (*CDH1*, *CSPG4*, *EFNA5*, *FYN*) та епітелійних маркерів (*CDH1*). Також в клітинних лініях раку передміхурової залози простежується активація сигнальних шляхів, відповідальних за посилення інвазивності, метастазування та ангиогенезу. Про це можуть свідчити підвищення рівнів експресії генів *S100A4*, *IL8*, та зниження рівнів експресії генів-інгібіторів серпінових пептидаз: *SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*. Таким чином, процесами, що зазнають найбільших змін експресії генів протягом переходу від неагресивних до агресивних типів раку ПЗ, змодельованому на клітинних лініях, є адгезія клітин, інвазивність та метастазування. За цими результатами відібрано низку генів, експресія яких відрізняється в андроген-чутливих та андроген-нечутливих клітинних лініях. Ці дані потребують підтвердження з використанням інших методів як на рівні мРНК, так і на рівні білка та можуть бути використані для подальшої розробки діагностичних панелей інвазивних і метастазуючих пухлин ПЗ.

Широко використовуваний у лікуванні метод андрогенної депривації андроген-чутливих пухлин передміхурової залози призводить до зменшення рівня чоловічих гормонів. Зниження рівня андрогенів сприяє уповільненню росту пухлин. Проте певний відсоток таких пухлин втрачає регуляцію андрогенами і прогресує до типу андроген-нечутливих пухлин. Для пошуку потенційних експресійних маркерів, що характеризують відмінності між андроген-чутливими (клітинна лінія LNCaP), які є менш агресивними, та андроген-нечутливими (клітинна лінія PC3) (більш агресивними) пухлинами передміхурової залози ми провели встановлення та порівняння рівнів BE 84

генів з використанням комерційного експресійного мікрочипу Cancer PathFinder RT2 Profiler PCR array PAHS-033 (Qiagen). Мікрочип містив 84 гени, пов'язані з клітинною проліферацією, ангіогенезом, клітинним циклом, апоптозом і метастазуванням (табл. 3.15). Аналіз отриманих даних ВЕ показав, що 36 генів мали зміни рівнів експресії у клітинній лінії PC3 порівняно з LNCaP більш ніж у 4 рази [639, 640]. З них, 10 генів мали підвищені рівні ВЕ, а 26 генів мали знижені рівні ВЕ у клітинній лінії PC3 порівняно з LNCaP.

У групі генів контролю клітинного циклу і репарації ДНК (14 досліджуваних генів) виявлено два гени з підвищеними рівнями ВЕ: *ATM*, *CDKN2A*. Чотири гени мають знижені рівні ВЕ у клітинній лінії PC3: *BRCA1*, *CDC25A*, *S100A4*, *TP53*. Досліджувані гени кодують білки, що відіграють важливі функції у процесі канцерогенезу. Ці зміни ВЕ свідчать високу агресивність досліджуваної клітинної лінії PC3. У цій групі генів у клітинній лінії PC3 спостерігається підвищення агресивності, про що свідчить підвищення ВЕ гена *ATM*, що сприяє росту пухлин ПЗ, та зниження експресії генів, які пригнічують ріст злоякісних новоутворень (*BRCA1*, *TP53*).

У групі 14 досліджуваних генів апоптозу і клітинного старіння шість з них мають підвищені рівні ВЕ: *BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *CASP8*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A*. З них два анти-апоптичних гени (*BCL2*, *BCL2L1*) і чотири про-апоптичних (*BAX*, *CASP8*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A*). Відомо, що експресія гена *BCL2* підвищена в раку ПЗ і сприяє переходу останнього до андроген-незалежного типу [641]. ВЕ гена *BCL2L1* у пухлинах ПЗ також підвищена і спричиняє резистентність до певних препаратів [642]. Ген *BAX* кодує асоційований з геном *BCL2* білок X, який виконує про-апоптичні функції [643]. Два гени *TNFRSF10B* та *TNFRSF1A* кодують рецептори факторів некрозу пухлин. Обидва рецептори можуть зв'язуватися з каспазою 8 та запускати апоптоз [644]. У групі генів апоптозу і клітинного старіння можна відмітити значне підвищення експресії анти-апоптичних генів на фоні меншого зростання про-апоптичних. Це може відображати один із механізмів набуття пухлинами агресивного фенотипу.

Таблиця 3.15.

Гени зі змінами ВЕ в клітинній лінії РС3 порівняно з LNCaP

Сигнальні шляхи	Гени	Підвищення експресії (к.р.)	Зниження експресії (к.р.)
Контроль клітинного циклу та репарація ДНК	<i>ATM</i>	8,60	
	<i>CDKN2A</i>	7,03	
	<i>BRCA1</i>		4,88
	<i>CDC25A</i>		4,31
	<i>S100A4</i>		9,69
	<i>TP53</i>		13,42
Апоптоз та клітинне старіння	<i>BAX</i>	6,75	
	<i>BCL2</i>	35,85	
	<i>BCL2L1</i>	13,49	
	<i>CASP8</i>	4,61	
	<i>TNFRSF10B</i>	5,29	
	<i>TNFRSF1A</i>	4,12	
Сигнальна трансдукція та транскрипційні фактори	<i>PIK3R1</i>	12,68	
	<i>ETS2</i>		4,81
	<i>FOS</i>		68,88
	<i>NFKBIA</i>		5,26
	<i>SNCG</i>		11,60
Адгезія	<i>ITGA1</i>	4,27	
	<i>ITGA3</i>	13,12	
	<i>ITGAV</i>	4,15	
	<i>MTSS1</i>	25,18	
	<i>ITGB1</i>	11,42	
	<i>MCAM</i>		14,08
	<i>EPDR1</i>	6,70	
Ангіогенез	<i>PDGFB</i>	4,51	
	<i>TGFB1</i>	11,50	
	<i>THBS1</i>	6,43	
	<i>VEGFA</i>	4,04	
Інвазивність та метастазування	<i>MET</i>	9,67	
	<i>MMP1</i>	28,72	
	<i>MTA2</i>	7,43	
	<i>NME4</i>	5,71	
	<i>PLAU</i>	28,32	
	<i>SERPINB5</i>	4,74	
	<i>SERPINE1</i>	6,04	
	<i>S100A4</i>		9,69
<i>TWIST1</i>		4,65	

Примітка. к.р. –кількість разів

Серед дванадцяти генів сигнальної трансдукції і транскрипційних факторів рівні BE у агресивній клітинній лінії PC3 мають значуще зниження у 4 генах, а саме *ETS2*, *FOS*, *NFKBIA*, *SNGG*, тоді як підвищення BE відмічено для гена *PIK3R1*. Експресія гена *PIK3R1* підвищена у злоякісних пухлинах ПЗ і потрібна для активації рецептора андрогенів [645]. Ген *ETS2* має зниження експресії в локалізованих пухлинах ПЗ, що можна пояснити «змаганням» за транскрипційну активацію з геном *ERG*, промоторна ділянка якого знаходиться в тій же області і транскрибується у протилежний бік [646]. Падіння експресії гена *FOS* свідчить про інгібування апоптозу [647]. Продукт гена *NFKBIA* є інгібітором сигнального шляху NF- κ B і демонструє зниження експресії при розвиненому раку ПЗ [648], що, ймовірно, свідчить про активацію цього шляху. Ген *SNGG* має знижену експресію у клітинній лінії PC3, як і в андроген-нечутливих пухлинах ПЗ [649]. Таким чином, у групі генів трансдукції і транскрипційних факторів відбувається зниження експресії генів, які кодують транскрипційні фактори (*ETS2*, *FOS*), а також гена *NFKBIA*, важливих для пригнічення росту пухлин, та підвищення експресії гена – активатора рецептора андрогенів. Це може свідчити про активацію шляху NF- κ B та інгібування процесів апоптозу у клітинній лінії PC3.

Шість з тринадцяти генів адгезії (*ITGA1*, *ITGA3*, *ITGB1*, *ITGAV*, *EPDR1*, *MTSS1*) мають підвищені рівні BE і лише один ген *MCAM* – знижену BE у клітинній лінії PC3. Підвищення BE генів, які кодують інтегрини є не лише одним з показників агресивності клітинної лінії PC3, але може свідчити про активацію проліферації і дедиференціації, які ними контролюються [650, 651].

Серед 16 досліджених генів ангиогенезу лише чотири гени: *PDGF*, *TGFBI*, *THBS1*, *VEGFA* мають підвищені рівні BE у більш агресивній клітинній лінії PC3. Ген *PDGF* кодує субодиницю В тромбоцитарного фактору росту. Він є маловивченим на відміну від рецептора цього ліганду, для якого знайдено кореляцію між підвищенням експресії і розвитком пухлин молочної залози [652]. Ген *TGFBI* кодує трансформуючий фактор росту бета 1. Його роль у канцерогенезі є досить неоднозначною: існують дані про його інгібувальний

вплив у клітинній лінії PC3 та, навпаки, про посилення росту клітин PC3 [653]. Ген *THBS1* кодує тромбоспондин 1 - інгібітор ангиогенезу, проте стимулює ріст клітин андроген-незалежної клітинної лінії PC3. За нашими даними його експресія підвищена в PC3 [654]. Ген *VEGFA* кодує судинний ендотелійний фактор росту А. Трансформуючий фактор росту бета 1 посилює експресію *VEGFA*, що призводить до підвищення міграції клітин раку ПЗ [655].

Для 7 з 16 генів групи інвазивності і метастазування виявлено підвищення ВЕ у клітинній лінії PC3: *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINB5*, *SERPINE1*, для генів *S100A4*, *TWIST1* навпаки зниження ВЕ [639, 656]. Ген *MET* кодує протоонкоген *met* [657]. Гени *PLAU* і *SERPINE1* кодують активатор плазміногена урокіназного типу та його інгібітор. Як відомо, в агресивних клітинних лініях раку ПЗ (DU145 і PC3) експресія гена *SERPINE1* знижується, однак підвищується експресія гена *PLAU* порівняно з нормальною лінією клітин PrEC та менш агресивною LNCaP [634]. Ген *SERPINB5* кодує інгібітор пептидази 5, який вважають здатним пригнічувати ріст пухлин молочної залози та ПЗ через його делеції у цих видах раку [658]. Ген *TWIST1* кодує один з головних транскрипційних факторів ЕМП, експресія якого підвищена в метастатичному раку ПЗ [659]. Зниження експресії цього гена в клітинній лінії PC3 відносно LNCaP в даному експерименті, можливо, відображає відмінності саме між двома клітинними лініями раку ПЗ. Незначне зростання експресії генів *SERPINE1* і *SERPINB5* порівняно із суттєвим підвищенням експресії гена *PLAU*, а також збільшення експресії генів *MET* і *MMP1* дають підставу припустити посилення інвазивності клітинної лінії PC3. Агресивні андроген-нечутливі пухлини відрізняються від андроген-залежних за ступенем інвазивності і метастазування, тому для пошуку потенційних біомаркерів нас цікавили саме гени, пов'язані з підвищенням агресивності, інвазивності і метастазування. Тому серед усіх генів зі зміненими рівнями ВЕ ми відібрали 14 генів згідно їх функцій та ролі у канцерогенезі, які представлено в табл. 3.16.

Для цих генів ми перевірили наявність секретованого білка для пошуку можливих біомаркерів на білковому рівні, що дає змогу визначати їх у

Таблиця 3.16.

Диференційно-експресовані гени – потенційні біомаркери агресивності і метастазування

Гени	Зміни експресії, к.р.	Гени	Зміни експресії, к.р.
<i>BCL2</i>	35,85 ↑	<i>VEGFA</i>	4,04 ↑
<i>BCL2L1</i>	13,49 ↑	<i>MET</i>	9,67↑
<i>FOS</i>	68,88 ↓	<i>MMP1</i>	28,72 ↑
<i>PIK3R1</i>	12,68 ↑	<i>MTA2</i>	7,43 ↑
<i>EPDR1</i>	6,7 ↑	<i>PLAU</i>	28,32 ↑
<i>ITGA3</i>	13,12 ↑	<i>SERPINE1</i>	6,04 ↑
<i>TGFBI</i>	11,5 ↑	<i>NME4</i>	5,71 ↑

Примітки: 1. к.р. – кількість разів; 2. ↑ - підвищення експресії, 3. ↓ - зниження експресії; 4. - ген має секретований білок

біологічних рідинах. З них два гени (*BCL2*, *BCL2L1*) з групи апоптозу та клітинного старіння, два (*PIK3R1*, *FOS*) – з групи сигнальної трансдукції і транскрипційних факторів, гени *ITGA3*, *EPDR1*– з групи адгезії, гени *TGFBI*, *VEGFA* – з групи ангиогенезу, шість генів: *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1* – з групи інвазивності і метастазування.

Сім генів (*MET*, *MMP1*, *PLAU*, *SERPINE1*, *EPDR1*, *TGFBI*, *VEGFA*) мають білки, що секретуються, і можуть в подальшому розглядатися як маркери на рівні білка для визначення їх у біологічних рідинах (кров, сеча).

3.3.2. Встановлення рівнів відносної експресії відібраних диференційно-експресованих на клітинних лініях генів у зразках пухлин передміхурової залози людини. Підсумовуючи результати двох досліджень на клітинних лініях раку ПЗ методом ПЛР у реальному часі ми відібрали низку генів для встановлення їх рівнів відносної експресії у клінічних зразках аденом, аденокарцином та УНТ передміхурової залози згідно їх функцій та ролі у канцерогенезі ПЗ. Це дозволить не тільки співставити результати отриманих досліджень, але й знайти диференційно-експресовані гени та визначити

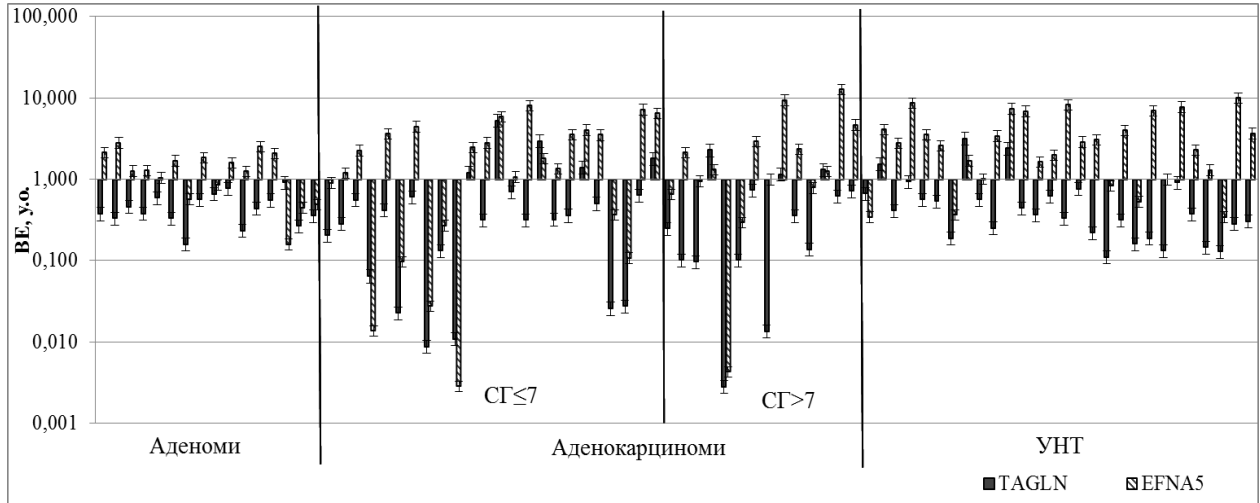
можливі сигнальні шляхи, які беруть участь у перетворенні в андроген незалежний тип пухлин. Досліджувані клітинні лінії раку ПЗ LNCaP, DU145 та PC3 мали різний потенціал агресивності та метастазування, а також чутливості до андрогенів. Клітини лінії LNCaP залежать від андрогенів, тоді як клітинна лінія PC3 - є андроген незалежною [616-618]. На підставі результатів цих експериментів для вивчення ВЕ генів на клінічних зразках були обрані наступні гени, враховуючи їх функції та вплив на канцерогенез, а саме *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, *EPDR1* і *FOS*. Ці гени задіяні в різних клітинних шляхах, наприклад, *EFNA5*, *TAGLN* та *EPDR1* відіграють важливу роль у адгезії клітин і взаємодії з міжклітинним матриксом, показники яких зменшуються при прогресуванні пухлини [660]. Крім того, ген *TAGLN* бере участь у шляху p53 сигнальному шляху [661] та ген *IL1B* – є важливим учасником процесів запалення та NF-kB сигнального шляху [662]. Виявлено, що ген *TGFBI* може сприяти посиленню ангиогенезу і активації ЕМП, який є ознакою прогресування пухлин [663]. У роботах [664-666] показано, що ген *PLAU* бере участь у контролі над агресивністю й розвитком метастазів. Білок, що кодується геном *FOS* є транскрипційним фактором, який бере участь у різних клітинних процесах, включаючи запалення та прогресію пухлин ПЗ зокрема [667, 668]. Отже, у даному дослідженні ми встановили рівні ВЕ генів *TGFBI*, *IL1B*, *FOS*, *EFNA5*, *TAGLN*, *PLAU* та *EPDR1* у 16 аденомах, 37 аденокарциномах ПЗ, з яких 29 зразків були парними з УНТ ПЗ. Результати аналізу ВЕ досліджуваних семи генів у зразках аденом, аденокарцином з різними сумами за шкалою Глісона ($CG \leq 7$ та $CG > 7$) та УНТ наведено на рис 3.24 а-в.

Серед зразків аденокарцином 23 з 37 мали $CG \leq 7$, та 14 зразків зі $CG > 7$. Крім того зразки злоякісних пухлин були різних стадій: 29 зразків мали 1-2 стадію, 8 зразків – 3-4 стадію захворювання.

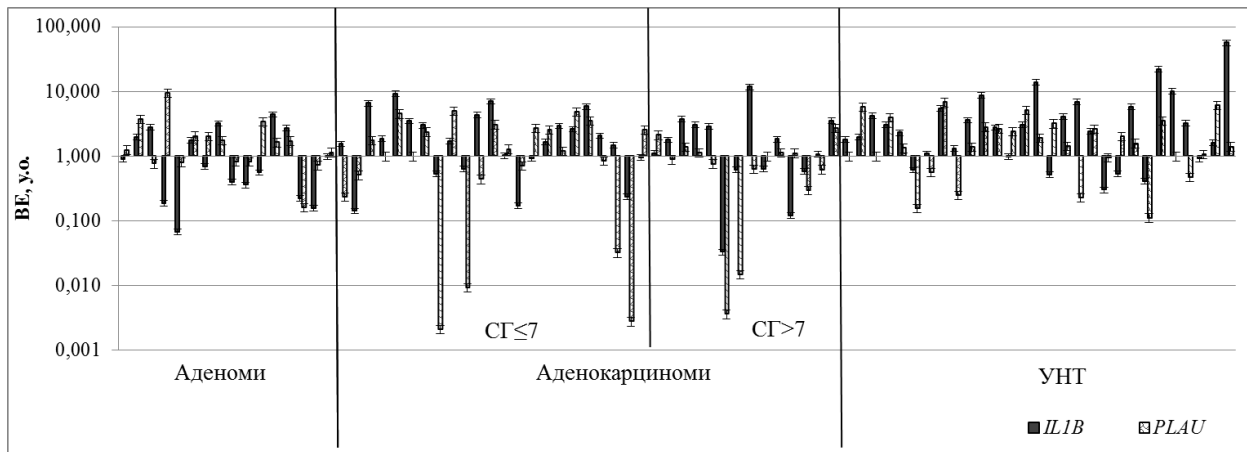
Добре відомо, що сума за шкалою Глісона використовується для класифікації раку передміхурової залози. Як описано у методичних інструкціях Європейської асоціації урологів [669, 670], пацієнти з локалізованим або локально розвиненим раком передміхурової залози зі CG більше 7 є групою

високого ризику рецидиву, тоді як СГ менш, або дорівнює 7 відноситься до групи з низьким ризиком [669]. Через це ми групували зразки злоякісних пухлин ПЗ у дві групи за СГ: $СГ \leq 7$ ($n = 23$) та $СГ > 7$ ($n = 14$).

a



б



в

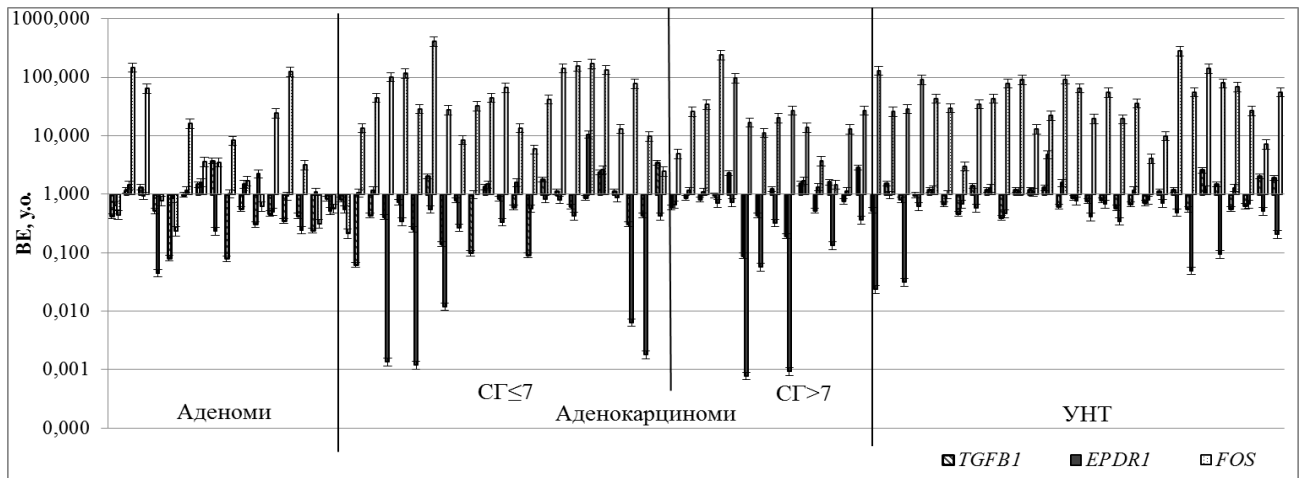


Рис. 3.24. Патерни відносної експресії генів *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFB1*, *EPDR1* та *FOS* у зразках пухлин передміхурової залози

Аналіз клінічних показників, таких як вік пацієнтів між групами аденом та карцином показав, що у групі пацієнтів з аденомами середній вік становив 66,5 років, у діапазоні 60-77 років. Тоді як у групі пацієнтів з аденокарциномами середній вік становив 63 роки, у діапазоні 48-80 років.

Встановлення нормальності розподілу даних BE за допомогою тестів Колмогорова-Смирнова та Ліліфорса показало ненормальні розподіли BE для деяких генів, за винятком *FOS*, *TAGLN* та *EPDR1* у карциномах та *IL1B* в УНТ. Тому всі статистичні процедури виконувались з використанням непараметричних тестів. Результати описової статистики BE генів у вигляді коробкових графіків представлено на рис. 3.25 а-є [671-673].

За даними тестів Краскела-Уолліса та Дана-Бонфероні для множинних порівнянь виявлено статистично значущі різниці BE для генів *IL1B* та *FOS*. У гена *IL1B* є різниця між групами аденом та УНТ ($p < 0,02$). Ген *FOS* має дві статистично значущі різниці між парами груп: аденоми та аденокарциноми зі ступенем Глісона < 7 ($p < 0,008$) та аденомами й УНТ ($p < 0,003$).

Для гена *FOS* виявлено й статистично значущу різницю між всіма аденокарциномами (без урахування СГ) та аденомами ($p < 0,013$). Крім того, ми виявили, що середні та медіанні значення BE генів *TAGLN*, *EFNA5* та *EPDR1* в аденомах були досить подібними. Примітно, що BE всіх генів показав високий рівень дисперсії в аденомах, карциномах та УНТ: наприклад, діапазон BE *FOS* у УНТ становив 3,028-285,813. Крім того, дисперсія рівнів BE всіх генів у групах УНТ, карциноми та аденомах була досить високою.

Для аналізу можливих зв'язків між рівнями BE у різних пухлинах передміхурової залози та клінічними характеристиками ми перевели дані BE у номінальні значення на основі експресії контрольного зразка з аденом щоб згенерувати таблиці спряженості. Рівні BE були розділені на 3 номінальних значення: 1-й - без змін (BE рівні в діапазоні 0.41-2.09), 2-й – знижені рівні BE ($RE \leq 0.4$) та 3-й - з підвищеними рівнями BE ($BE \geq 2.1$). Створені таблиці спряженості, де в рядках є номінальне значення BE, а в стовпцях - номінальне значення груп наведено у табл. 3.17 для аденом, аденокарцином та УНТ.

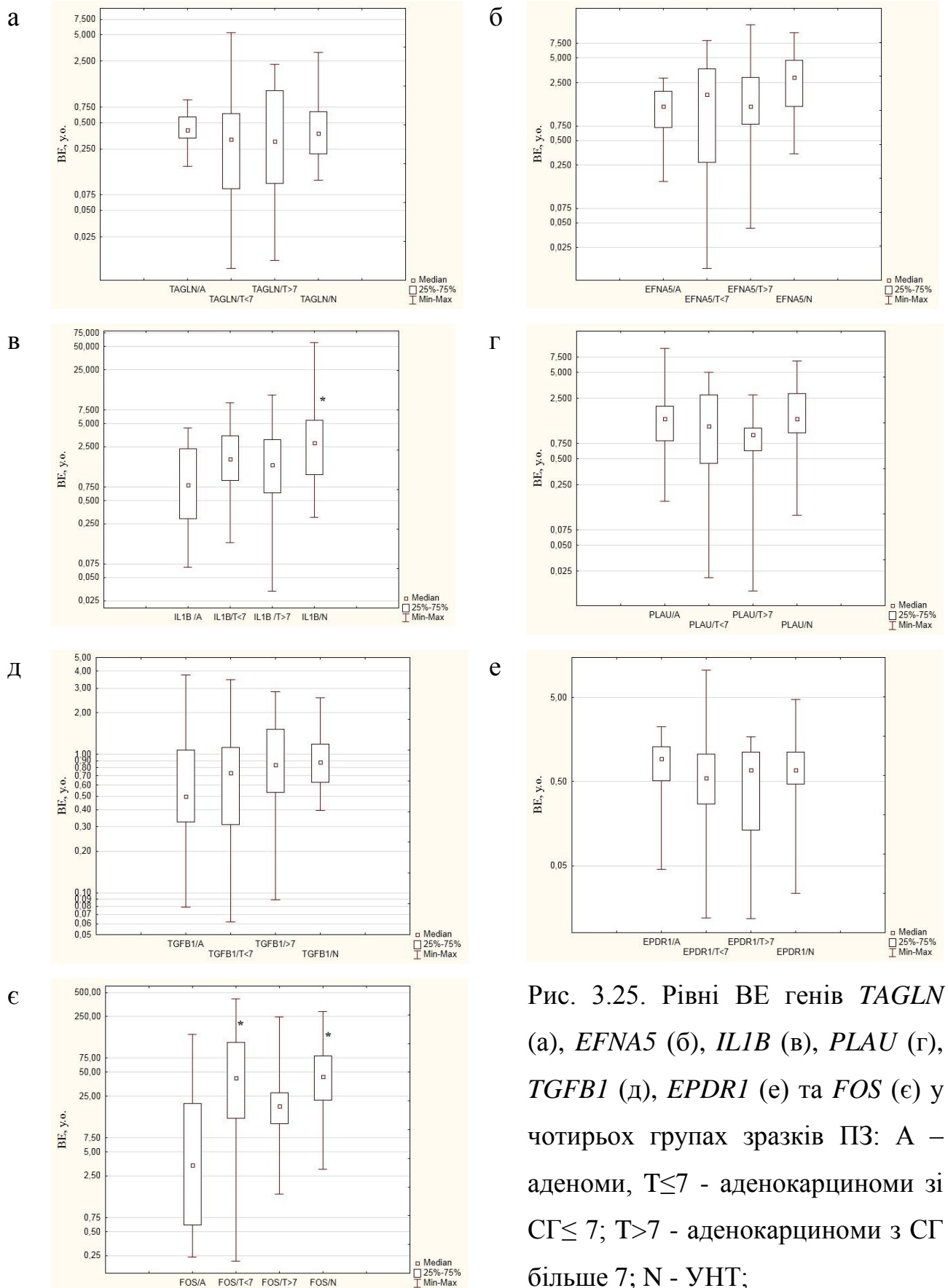


Рис. 3.25. Рівні BE генів *TAGLN* (а), *EFNA5* (б), *IL1B* (в), *PLAU* (г), *TGFB1* (д), *EPDR1* (е) та *FOS* (е) у чотирьох групах зразків ПЗ: А – аденоми, T \leq 7 - аденокарциноми зі СГ \leq 7; T $>$ 7 - аденокарциноми з СГ більше 7; N - УНТ;

* - значущі відмінності за тестом Краскела-Уолліса та Дана-Бонфероні тестом для множинних порівнянь (p $<$ 0,05) у порівнянні з групою аденом

На підставі аналізу даних, представлених у табл. 3.17, виявлено 4 гени зі статистично значущими відмінностями між групами зразків аденом, аденокарцином та УНТ: *FOS* ($p = 0,0001$), *EFNA5* ($p = 0,0030$), *IL1B* ($p = 0,0180$)

Таблиця 3.17.

Показники спряженості ВЕ між аденомами, аденокарциномами та УНТ

Ген	ВЕ	Кількість зразків з відповідними змінами ВЕ		
		Група зразків		
		Аденоми (n = 16)	Аденокарциноми (n = 37)	УНТ (n = 29)
<i>TGFBI</i>	I	9	24	27
	II	6²	9³	1^{2,3}
	III	1	4³	1³
<i>IL1B</i>	I	6	18	11
	II	6²	5	1²
	III	4²	14	17²
<i>FOS</i>	I	5	1	0
	II	2	1	0
	III	9^{1,2}	35¹	29²
<i>EFNA5</i>	I	12	10	8
	II	1¹	10¹	3
	III	3^{1,2}	17¹	18²
<i>TAGLN</i>	I	9	13	12
	II	7	21	15
	III	0	3	2
<i>PLAU</i>	I	12	17	13
	II	1	9	5
	III	3	11	11
<i>EPDR1</i>	I	12	21	22
	II	3	14	6
	III	1	2	1

Примітки: 1. Рівні ВЕ: I – 0,41–2,09, II – $\leq 0,4$, III – $\geq 2,1$; 2. Статистична значимість за точним тестом Фішера: ¹ – значуща різниця між аденомами та аденокарциномами; ² – значуща різниця між аденомами та УНТ; ³ – значуща різниця між аденокарциномами та УНТ; 3. Жирним шрифтом відмічено значення частот зі значущими відмінностями між групами

і *TGFBI* ($p = 0,0300$). Статистично значущі зміни спостерігались між аденомами та аденокарциномами у ВЕ генів *FOS* ($p = 0,0026$) та *EFNA5* ($p =$

0,0047). Крім того, знайдено зміни ВЕ між аденокарциномами та УНТ для гена *TGFBI* ($p = 0,0233$). Також виявлено зміни, між аденомами та УНТ в ВЕ генів *FOS* ($p = 0.0005$), *IL1B* ($p = 0.0061$), *TGFBI* ($p = 0.0082$) та *EFNA5* ($p = 0.0084$).

Крім того, ми розраховали таблиці спряженості для ВЕ досліджуваних генів для трьох груп зразків з урахуванням СГ: аденоми, аденокарциноми СГ \leq 7, аденокарциноми СГ $>$ 7. Дані наведено у табл. 3.18.

Таблиця 3.18.

Показники спряженості ВЕ між аденомами та аденокарциномами ПЗ з різними СГ

Гени	ВЕ	Кількість зразків з відповідними змінами ВЕ		
		Групи зразків		
		<i>Аденоми</i> ($n = 16$)	<i>Аденокарциноми</i> СГ ≤ 7 ($n = 23$)	<i>Аденокарциноми</i> СГ > 7 ($n = 14$)
<i>TGFBI</i>	I	9	14	10
	II	6	7	2
	III	1	2	2
<i>IL1B</i>	I	6	11	7
	II	6	3	2
	III	4	9	5
<i>FOS</i>	I	5	0	1
	II	2	1	0
	III	9¹	22¹	13
<i>EFNA5</i>	I	12	4	6
	II	1¹	8¹	2
	III	3¹	11¹	6
<i>TAGLN</i>	I	9	8	5
	II	7	13	8
	III	0	2	1
<i>PLAU</i>	I	12	9	8
	II	1	5	4
	III	3	9	2
<i>EPDR1</i>	I	12	13	8
	II	3	8	6
	III	1	2	0

Примітки: 1. Рівні ВЕ: I – 0.41–2,09, II – $\leq 0,4$, III – $\geq 2,1$; 2. Статистична значимість згідно точного тесту Фішера,: ¹ – значуща різниця між аденомами та аденокарциномами з СГ \leq 7; 3. Жирним шрифтом відмічено значення частот зі значущими відмінностями між групами

Аналіз даних, наведених у табл. 3.18 не виявив відмінностей у частотах змін ВЕ у номінальному значенні з різним СГ окрім генів *FOS* ($p=0,0134$) та *EFNA5* ($p=0,0077$), які показали зміну ВЕ між аденокарциномами та аденомами. Зокрема, знайдено відмінності між аденомами та аденокарциномами з $СГ \leq 7$ (*FOS* $p = 0,0073$; *EFNA5* $p = 0,0014$) [671].

Як ми вже акцентували, добре відомо, що рак ПЗ дуже гетерогенний і навіть пухлина у одного пацієнта може бути мультифокальною та мати різні гістологічні підтипи [674, 675]. Молекулярна природа такої неоднорідності все ще не з'ясована. Тому важливо показати будь-які відмінності між пухлиною та УНТ, отриманими з однієї і тієї ж ПЗ. Ми порівняли значення ВЕ у парних зразках аденокарцинома-УНТ, використовуючи парний тест Вілкоксона, і знайшли диференційну ВЕ гена *PLAU* ($p = 0,039$) між пухлинами та парними УНТ. Для інших генів різниці між парними зразками не виявлено. Далі ми обчислили відсоток змін ВЕ більше, ніж у 2 рази (збільшення, або зменшення рівнів ВЕ) [577, 583] для парних зразків пухлина-УНТ. Виявлено, що ВЕ гена *TGFBI* у 27,6% аденокарцином знижена, а у 6,9% зразків підвищена у порівнянні з парними УНТ. Знижену та підвищену ВЕ гена *IL1B* мають 27,6% та 17,3% зразків пухлин відповідно. Тобто, зміни ВЕ досліджуваних генів мають різноспрямований характер у пухлинах ПЗ.

Результати точного тесту Фішера на базі критерію перестановок змін ВЕ досліджуваних генів та рівнів ПСА у крові пацієнтів, а також стадій захворювання не виявило жодних значущих різниць між групами. Крім того, ми не знайшли кореляції між згаданими вище показниками (включаючи СГ), використовуючи тест рангової кореляції за Спірменом. Проте ми виявили значущі прямі кореляції між ВЕ усіх генів ($r^s=0,42-0,60$), за винятком гена *FOS*. Проведення регресійного аналізу між експресією генів та рівнем ПСА менше та більше 20,0 нг / мл знайдено позитивну кореляцію ВЕ гена *IL1B* та рівнем ПСА у пацієнтів з незначним підвищенням рівня ПСА не більше 20,0 нг/мл ($p=0,038$).

Отже, порівняльний аналіз відносної експресії 65 та 84 генів на модельних ракових клітинних лініях ПЗ LNCaP, DU145, PC3 та нормальної клітинної лінії PNT2 виявив низку диференційно-експресованих генів, які належать до сигнальних шляхів p53, NF-kB, Wnt, адгезії клітин, інвазивності та метастазування, серед них гени *IL1B*, *TAGLN*, *EFNA5*, *IL8*, *CXCL1*, *CCNB2*. Виявлено шляхи, які мають найбільш значущі відмінності при підвищенні агресивності між клітинними лініями LNCaP та PC3, до них належать шляхи апоптозу, адгезії, інвазивності та метастазування в яких порушено експресію генів *MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *TGFBI*, *SERPINB5*, *SERPINE1* та ін. Відібрані за результатами дослідів на клітинних лініях 7 диференційно-експресованих генів: *TAGLN*, *EFNA5*, *IL1B*, *PLAU*, *TGFBI*, *EPDR1* та *FOS*, показали значущі відмінності ВЕ у групах аденокарцином з різними стадіями та СГ, УНТ та аденом передміхурової залози, що лише частково співпадає з результатами експресії на клітинних лініях.

Роботи опубліковані за матеріалами цього підрозділу: [619, 639, 640, 658, 671, 672, 673].

3.4. Встановлення особливостей експресії генів-маркерів клітин пухлин та елементів стромы раку передміхурової залози.

Згідно сучасним уявленням про механізми канцерогенезу, які умовно можна поділити на два типи моделей. Перші визнають, що саме порушення у епітелійних пухлинах є причиною виникнення злоякісних новоутворень [74, 85, 134], тоді як інші надають змінам у стромі органів та тканин й екстрацелюлярному матриксу провідну роль у цьому процесі [68, 101, 105, 111, 135]. І одні, й другі наводять переконливі докази й вагомні експериментальні підтвердження щодо істинності існування саме їх моделі. Але відкинути жодну з цих моделей неможливо, так як вони описують різні ланки та рівні складного й непередбачуваного процесу злоякісної трансформації та переродження нормальних тканин у пухлинні. Важливо знайти як само можуть доповнити

одна одну ці моделі і у якому взаємозв'язку вони знаходяться, щоб відкрити механізми впливу та зупинення прогресування пухлин в організмі людини.

Ми вважаємо, що пошук показників адекватного молекулярного профілювання пухлин, що мають кореляції з клініко-патологічними характеристиками пухлин, є пухлино-специфічними або пухлино-асоційованими. Вони включають в себе як маркери стану, агресивності та чутливості до певних ліків клітин пухлини, так і виявлення характеристик пухлинного мікрооточення (строми тканин та органів), які можуть дати певне уявлення про стан та можливості організму [317, 318]. Це є важливим завданням як для виявлення особливих властивостей пухлин та розкриття механізмів канцерогенезу окремих пухлин у фундаментальному плані, так і можуть мати майбутнє практичне застосування для цілей діагностики, постановки діагнозу, підбору ефективного лікування, і прогнозу перебігу захворювання на рак завдяки розробці наборів молекулярного профілювання та панелей діагностичних та фармакологічних біомаркерів.

Для досягнення цих завдань ми обрали пошук диференційно-експресованих генів-маркерів клітин пухлин та елементів строми у злоякісних та доброякісних пухлинах передміхурової залози та УНТ за допомогою ПЛР у реальному часі.

3.4.1. Встановлення впливу рівнів експресії референсних й досліджуваних генів на показники відносної експресії у кПЛР аналізі. Першим етапом встановлення рівнів відносної експресії генів є підбір та аналіз способів нормалізації даних для отримання адекватних та достовірних результатів відносної експресії генів у пухлинах передміхурової залози. Для цього ми обрали варіанти нормалізації на один, два та чотири референсних гени (*TBP*, *HPRT*, *ALAS1*, *TUBA1B*), які за даними літератури мають стабільну експресію у пухлинах передміхурової залози, які й були нами обрані [676]. Отже, для нормалізації розрахунків рівнів ВЕ ми обрали наступні комбінації : 1 референсний ген – *TBP*, 2 референсних гени - *TBP*, *HPRT*, та 4 референсних гени - *TBP*, *HPRT*, *ALAS1*, *TUBA1B*.

Для дослідження обрано 23 гени, які є маркерами фіброblastів та пухлино-асоційованих фіброblastів (ПАФ), макрофагів та пухлино-асоційованих макрофагів (ПАМ) та гени, що асоційовані з імунними реакціями та відповіддю (ІАГ). За рівнями експресії гени умовно можна поділити на наступні групи: високо-експресовані гени ($Ct < 20$ циклу), гени із середнім рівнем експресії ($Ct = 20-29$ цикли) та низько-експресовані гени ($Ct > 29$ цикл).

Референсні гени *ALAS1* та *TUBA1B* показали високі рівні експресії, тоді як експресію *TBP* та *HPRT* можна віднести до генів з середнім рівнем експресії. Серед досліджуваних генів тільки 3 гени з 23 генів - *ACTA2*, *MSMB* та *HLA-G* мають високі рівні ВЕ. Десять генів мають середні рівні експресії та десять генів мають низький рівень експресії.

Існує думка, що велика різниця в рівнях експресії досліджуваних та референсних генів призводить до отримання помилкових результатів ВЕ. Тому ми спочатку провели теоретичний розрахунок можливих помилок при підрахунку ВЕ генів з різними рівнями ВЕ. Дані наведені у табл. 3.19.

Наші розрахунки показали, що відхилення ВЕ з помилкою у 0,5 цикли для референсних генів була однаковою (1,414 разів) для всіх досліджуваних генів незалежно від рівнів експресії ні референсні, ні досліджуваних генів (табл. 3.19). Ці дані свідчать про важливість показника стійкості рівня експресії референсного гена, як превалюючого для аналізу ВЕ генів.

Експериментальні дані отримано за моделями $2^{-\Delta Ct}$ та $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Спочатку ми розраховували ВЕ для парних зразків пухлин передміхурової залози (П) та УНТ для 23 досліджуваних генів (табл. 3.20) за моделлю $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Ми вважали значущими зміни ВЕ більш або менш 2 рази. Наші дані свідчать, що статистично значущі зміни за тестом Фішера з поправкою на множинні порівняння з $FDR=0,2$ мають 17 з 23 генів.

Повне співпадіння статистичних даних спостерігалось для всіх груп референсні генів у 16 з 23 досліджуваних генів. Одинадцять з 16 генів мали статистично значущі різниці ВЕ між П/УНТ групами. Серед них 7 високо-експресованих та середньо-експресованих генів.

Таблиця 3.19.

Розрахунок змін ВЕ досліджуваних генів (досл) та референтних (реф), які мають різні рівні ВЕ (високий (в), середній (с), низький (н)) при гіпотетичній помилці у 0,5 Ст цикли (п)

Гени	Ст Реф	Досл 1 н	Досл 2 в
Ст Досл		31	17
ВЕ /Реф в	15	0.000015	0.250
ВЕ /Реф вп	15.5	0.000022	0.354
ВЕ /Реф с	25	0.016	256.000
ВЕ /Реф сп	25.5	0.022	362.039
ВЕ /Реф н	32	2.000	32768.000
ВЕ /Реф нп	32.5	2.828	46340.950
Відхилення ВЕ (к.р.) Реф вп/в		1.414	1.414
Відхилення ВЕ (к.р.) Реф сп/с		1.414	1.414
Відхилення ВЕ (к.р.) Реф нп/н		1.414	1.414

Примітки: 1. Реф в – референтний ген з високим рівнем ВЕ; 2 Реф вп - Реф в з 0,5 Ст помилкою ВЕ; 3 Реф с – референтний ген з середнім рівнем ВЕ; 4 Реф сп – Реф с з 0,5 Ст помилкою ВЕ; 5. Реф н – референтний ген з низьким рівнем ВЕ; 6. Реф нп - Реф н з з 0,5 Ст помилкою ВЕ; 7. к.р. – кількість разів

Розбіжності у значеннях ВЕ спостерігались у 7 з 10 досліджуваних генів, 6 з яких мали низькі рівні ВЕ. Так, пороговий рівень співпадінь між значущими різницями для високо- та середньо-експресованих генів становив 25-30% зразків (10-11 пар зразків з 37), тоді як для низько експресованих генів цей показник має бути не меншим за 35% (більше, ніж 13 пар зразків з 37) для

Таблиця 3.20.

Кількість зразків аденокарцином зі змінами ВЕ у порівнянні з парними
УНТ, нормалізовані на 1, 2 та 4 референсних (реф.) гени

Група генів	Гени	1 реф.ген		2 реф.гени		4 реф. гени	
		>2,01	<0,49	>2,01	<0,49	>2,01	<0,49
ПАФ	<i>ACTA2</i>	9	4	9	3	7 ^{&}	3
	<i>CXCL14</i>	19	3	19	4	17	4
	<i>CTGF</i>	12	0	12	2	11	1
	<i>HIF1A</i>	5	0	3	0	3	0
	<i>S100A4</i>	3	6	3	5	2	5
	<i>THY1</i>	9	3	9	2	7 ^{&}	1
	<i>CXCL12</i>	4	7	5	6	4	6
	<i>FAP</i>	12	0	11	1	13	1
ПАМ	<i>CD68</i>	8	4	6	3	5	6
	<i>CD163</i>	14	5	12	6	11	5
	<i>CCR4</i>	8	9	6	8	5	10
	<i>CCL17</i>	8	6	9	8	10	8
	<i>CCL22</i>	10	8	6	7	6	6
	<i>NOS2A</i>	7	16	6	13	4	15
ІАГ	<i>MSMB</i>	6	10	5	10	6	9
	<i>HLA-G</i>	2	3	3	4	4	2
	<i>IRF1</i>	3	6	4	7	3	6
	<i>IL1R1</i>	1	11	1	8	1	8
	<i>CIAS</i>	4	6	4	6	3	5
	<i>CTLA4</i>	5	11	8	12	6	7
	<i>IL1RL1</i>	2	11	3	8	3	7
	<i>IL2RA</i>	8	8	8	7	7	6
	<i>KLRK</i>	8	10	8	9	7	4

Примітки: 1. жирним шрифтом (чорний та червоний) - статистично значущі різниці за точним тестом Фішера з FDR=0,2 між групами П/УНТ: чорний – статистично значущі зміни в усіх групах референсних генів (співпадіння), червоний – розбіжності у результатах статистичної обробки для груп референсних генів; 2. [&] - статистично значущі відмінності при FDR=0,2; 3. зелені ячейки – високо-експресовані гени; 4. білі ячейки – середньо-експресовані гени; 5. рожеві ячейки – низько-експресовані гени

запобігання можливого впливу помилок експресії генів та інгібіторів кПЛР реакцій для низько-експресованих генів [676].

Наступні дослідження проведено на аденокарциномах, аденомах та УНТ за моделлю $2^{-\Delta Ct}$ з урахуванням патологічних характеристик пухлин та поділом зразків на наступні групи: 1. ПНА групування – всього 3 групи зразків: аденокарциноми (П, n=37), умовно-нормальних тканин передміхурової залози (УНТ) (Н, n=37) та аденоми (А, n=20);

2. Групування з урахуванням стадій захворювання - 5 груп зразків: аденокарциноми 1-2 стадії (П1-2, n=28), аденокарциноми 3-4 стадії (П3-4, n=9), УНТ 1-2 стадії (парні зразки до П1-2) (Н1-2, n=28), УНТ 3-4 стадії (парні зразки до П3-4) (Н3-4, n=9), аденоми (А, n=20);

3. Групування з урахуванням суми за шкалою Глісона (СГ) – 7 груп: аденокарциноми СГ<7 (П<7, n=11), аденокарциноми СГ=7 (П=7, n=9), аденокарциноми СГ>7 (П>7, n=17), УНТ СГ<7 (Н<7, n=11), УНТ СГ=7 (Н=7, n=9), УНТ СГ>7 (Н>7, n=17), аденоми (А, n=20).

Статистично значущі зміни ВЕ досліджуваних генів між групами зразків у кількості разів та *p-рівні* для всіх трьох варіантів нормалізації референсних генів наведено у додатках Е, Ж, З.

Високий рівень співпадіння статистично-значущих змін ВЕ між трьома різними групами нормалізації спостерігається для всіх типів групування зразків. Так, у ПНА групах цей показник становить більше, ніж 82% від усіх змін. При урахуванні стадій відсоток співпадінь змін становить 69%, а при групуванні на СГ – 64,5%.

З 23 генів при ПНА групуванні зразків зміни ВЕ знайдено у 10-и генах (додаток Е). 17 пар груп зразків мають ці зміни. Розбіжності між трьома типами нормалізації знайдено у 17,65% даних зі змінами ВЕ при показниках змін ВЕ менш ніж 1,7 разів.

Інший тип групування зразків (з урахуванням стадій) продемонстрував зміни ВЕ для 14 генів у 45 парах груп зразків (додаток Ж). Розбіжності між трьома типами нормалізації спостерігались для 14 пар груп зразків, що

становить 31% від усіх змін та при зниженні різниці ВЕ менш ніж 3-4 рази. Ці показники перевищують значення попереднього типу групування зразків (ПНА), де у групах кількість зразків становила від 20 до 37. Тоді як у цьому типі групування кількість зразків у групах від 9 до 28.

Третій вид групування зразків за СГ (додаток 3) показав статистично значущі зміни для 12 генів з 23 досліджених у 31 парі груп зразків. Розбіжності між трьома типами нормалізації спостерігаються для 11 груп зразків, що становить 35,5% від усіх змін які з'являються при зниженні змін ВЕ генів більше, ніж у 5 разів. Такий високий поріг змін, які є статистично значущими можна пояснити за рахунок зменшення кількості зразків у групах від 9 до 20 у порівнянні з попередніми типами групування зразків.

Вірогідно, при самих великих у даному дослідженні кількостях зразків у групах при ПНА групуванні обмежуючим фактором виявляється низька експресія досліджуваних генів. Відомо, що при цьому типі експресії протягом ПЛР реакції відбувається накопичення різних видів інгібіторів реакції. Мається на увазі формування димерів праймерів та накопичення можливих неспецифічних продуктів, а також втрата активності Tag-полімерази зі збільшенням значень циклів [677-679]. Усі ці фактори можуть непередбачувано впливати на ефективність індивідуальної ПЛР реакції, що у результаті дає помилкові рівні ВЕ. У свою чергу, це призводить до труднощів у трактуванні ВЕ низько-експресованих генів, не дивлячись навіть на оптимізацію умов кПЛР. Особливо це важливо, якщо референсний ген має низький рівень експресії. Тому, зазвичай ці гени не використовуються у якості референсних.

Інший параметр, що впливає на значущість змін ВЕ – це кількість разів змін ВЕ між парами груп. Високо гетерогенна експресія генів при раці передміхурової залози робить це завдання більш складним. Мається на увазі, якщо між групами велика різниця ВЕ, тобто різняться не у 2 рази, а у 10 разів та більше, невеликі відхилення даних Ct референсних та досліджуваних генів не мають впливу на результат ВЕ, як свідчать наші дані та результати інших дослідників [680, 681]. Однак, коли порівнюються зміни у 2 рази та нижче, або

відсоток змін становить нижче 30% від досліджуваних зразків, можливе отримання як хибно позитивного, так і хибно негативного результату аналізу з використанням як $2^{-\Delta Ct}$, так і $2^{-\Delta\Delta Ct}$ моделей.

Наступний важливий фактор, який впливає на результат статистичного аналізу ВЕ є кількість зразків у групах [682]. Вище ми аналізували цей вплив. Наприклад, якщо при ПНА групуванні де найбільша кількість зразків у групі (20-37) ми спостерігали найнижчий рівень неспівпадінь статистичних даних між різними типами нормалізацій та найвищий рівень співпадінь (82%). Крім того, цей розмір вибірки дозволяє говорити про статистично-значущі відмінності ВЕ між групами більші ніж 1,7 разів, тоді як для інших типів групування зразків з меншими розмірами вибірки у групах ці показники набагато нижчі (співпадіння), або вищі (зміни ВЕ у кількості разів).

Тип групування є не менш важливим фактором, ніж кількість зразків. І такі показники, як наявність кореляції ВЕ генів з клінічними та патологічними характеристиками вносять свій вклад у результати досліджень. Так, наприклад, якщо низка генів не мали змін при загальному групуванні у групі аденокарцином, то при урахуванні стадії чи СГ у них з'являлись статистично значущі відмінності ВЕ. Таке спостерігалось для генів *HIF1A*, *CD68*, *CCL22*, *NOS2A1* при групуванні за стадіями, а у генів *HIF1A*, *CCL22*, *NOS2A*, *IL2RA1* з'являлись зміни ВЕ при врахуванні СГ. Тоді як у загальній групі П зміни ВЕ виявлені не були, а дані мали вигляд високої гетерогенної експресії у групі аденокарцином.

Отже, всі три типи нормалізації референсних генів можуть бути використані для розрахунків ВЕ генів для зразків пухлин передміхурової залози. Відмінності у рівнях експресії досліджуваних і референсних генів не мають впливу, незалежно від використання моделей $2^{-\Delta Ct}$ та $2^{-\Delta\Delta Ct}$; тоді як стабільність експресії референсних генів є важливим параметром у дослідженні. Крім цього, рівні експресії досліджуваних генів, а також рівень змін значень ВЕ, кількість зразків у групах та висока гетерогенність експресії

генів є важливими параметрами для вибору порогового рівня відмінностей між групами зразків для вірної інтерпретації даних.

3.4.2. Встановлення та аналіз рівнів ВЕ генів, що задіяні у епітелійно-мезенхімному переході клітин раку передміхурової залози, онкогенних гібридних транскриптів та довгих некодувальних РНК. Одним із критичних молекулярних процесів при розвитку та прогресуванні пухлин є ЕМП. Це процес втрачання епітелійними клітинами своїх характеристик та властивостей та набуття ними властивостей мезенхімних клітин [383, 683].

Відомо, що в процес ЕМП залучено багато генів. Добре охарактеризовані зміни у патернах експресії генів, що характеризують як для епітелійні, так і мезенхімні клітини [385, 684]. Ми проаналізували гени, залучені до ЕПМ, особливо ті, що пов'язані з екстрацелюлярним матриксом та передачею сигналів, їх можливі функції та роль у цьому процесі. У результаті ми обрали низку таких генів, щоб вивчити їх експресію та встановити, чи можуть вони бути біомаркерами та / або молекулярними класифікаторами підтипів раку ПЗ.

Одним з частих явищ у канцерогенезі передміхурової залози, яке також впливає на процес ЕМП, є утворення гібридних транскриптів (ГТ) генів, які мають онкогенні властивості. Зазвичай 5'-частина транскриптів – це андроген-регульовані гени *TMPRSS2*, *KLK2*, *CANT1*, *SLC45A3* та *NDRG1*, досить високі рівні експресії та «сильні» промотори [684-686]. Їх 3'-партнерами виступають гени родини *ETS*: *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5*, які є транскрипційними факторами, та завдяки андроген-регульованим частинам у злитому транскрипті мають підвищення експресії у пухлинах та проявляють онкогенні властивості [684]. Механізми утворення гібридних транскриптів не є чітко встановленими, але відомо, що їх появі можуть сприяти як генетичні порушення (делеції, транслокації) [687], так і транскрипційно-опосередковані процеси, зокрема, транссплайсинг [688, 689]. Білковими продуктами ГТ можуть бути як злиті білки, так і тільки онкогенні білки родини *ETS*. В роботах авторів з різних країн, які висвітлювали результати досліджень експресії гібридних транскриптів у пухлинах передміхурової залози пацієнтів з різних когорт

показано наявність специфічних ГТ з певною частотою у людських популяціях, наприклад США [690], Німеччини [691], Індії [692], Швеції [693] та Китаї [694]. Враховуючи високу частоту, з якою ГТ зустрічаються у пухлинах передміхурової залози у різних людських популяціях ми вважали актуальним дослідити які саме з цих ГТ наявні у хворих в Україні, з якою частотою вони зустрічаються та з якими клініко-патологічними характеристиками мають зв'язок та кореляції. І головне, чи можна їх використовувати у діагностиці та прогнозі захворювання й чи має це відношення до підбору терапії.

У базах даних NCBI анотовано 6 різних ГТ гена *TMPRSS2*, який є мішенню сигнального шляху андрогенового рецептора, тобто андроген-регульований ген. Анотовані транскрипти були знайдені у пухлинах передміхурової залози в різних популяціях. Було досліджено наступні ГТ: *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1), *TMPRSS2-ETV1a* (DQ204770.1), *TMPRSS2-ETV1b* (DQ204771.1), *TMPRSS2-ETV4a* (DQ396625), *TMPRSS2-ETV5b* (EU314930), *TMPRSS2-ETV5c* (EU314931). З цих шести ГТ на 37 зразках аденокарцином передміхурової залози та парних УНТ й 20 аденомах детектовано експресію тільки одного транскрипта - *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1) [695]. Він описаний у роботі Lapointe J. як *TMPRSS2-ERG* (2 ізоформа) [696]. Фрагмент сиквенса та встановлена послідовність цього транскрипта, яка відповідає очікуваному *TMPRSS2-ERG* наведено на рис. 3.26.

Патерн експресії ГТ *TMPRSS2-ERG* у зразках пухлин та УНТ передміхурової залози наведено на рис. 3.27. Середній показник BE групи аденом розраховано за моделлю 2^{-ddCt} . З 20-и аденом наявність експресії *TMPRSS2-ERG* виявлено лише у 4-х, що становить 20% від кількості зрізків у групі, тоді як у групі аденокарцином цей показник набагато вищий. Взагалі серед 37 аденокарцином виявлено експресію ГТ у 21 зразку злоякісних пухлин. Це становить 56,8%, підтверджуючи дані літератури, де цей показник складає від 40 до 80% [686, 691]. У парних УНТ з 37 зразків виявлено 16 з експресією ГТ *TMPRSS2-ERG*, що становить 43% від групи УНТ. Серед аденокарцином з різним СГ показники експресії за частотою є такими: із 11 П з СГ<7 виявлено 6

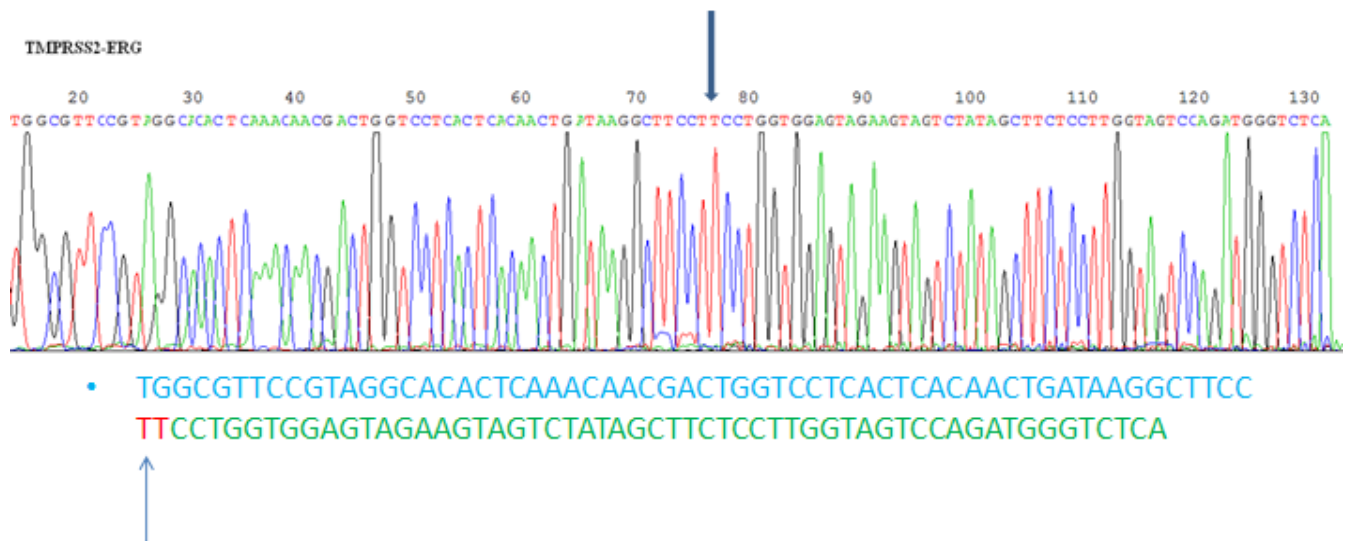


Рис. 3.26. Фрагмент сиквенса гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* з пухлини передміхурової залози (стрілкою вказано місце стику), нижче – відповідна нуклеотидна послідовність частини зазначеного ГТ *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1)

зразків з експресією ГТ *TMPRSS2-ERG* (54,5%), з 9 П СГ=7 знайдено 7 зразків (77,8%) та з 17 зразків СГ>7 - 9 зразків з експресією ГТ (52,9%). Порівняння частот зразків з експресією ГТ (ГТ позитивні) та його відсутністю (ГТ негативні) при наявній вибірці зразків не дає значущої різниці між групами аденокарцином з різним СГ. Така ж ситуація (відсутність значущої різниці між частотами) відбувається з порівнянням зразків, ГТ позитивних та негативних з різними стадіями, рівнем ПСА. Пошук кореляцій за Спірменом не підтвердив їх наявність між частотою появи гібридного транскрипта та клініко-патологічними характеристиками досліджуваних зразків. Тобто можна припустити, що зміни у клітинах, що призводять до початку експресії ГТ *TMPRSS2-ERG* можуть відбуватися на ранніх стадіях канцерогенезу. Що дає можливість надалі умовно ділити пухлини на ГТ-позитивні та ГТ-негативні.

Порівняння рівнів ВЕ ГТ *TMPRSS2-ERG* між групами аденокарцином, УНТ та аденом з різними СГ та стадіями за даними тесту Краскела-Уолліса показало значущі відмінності ($p=0,001$) між групами зразків.

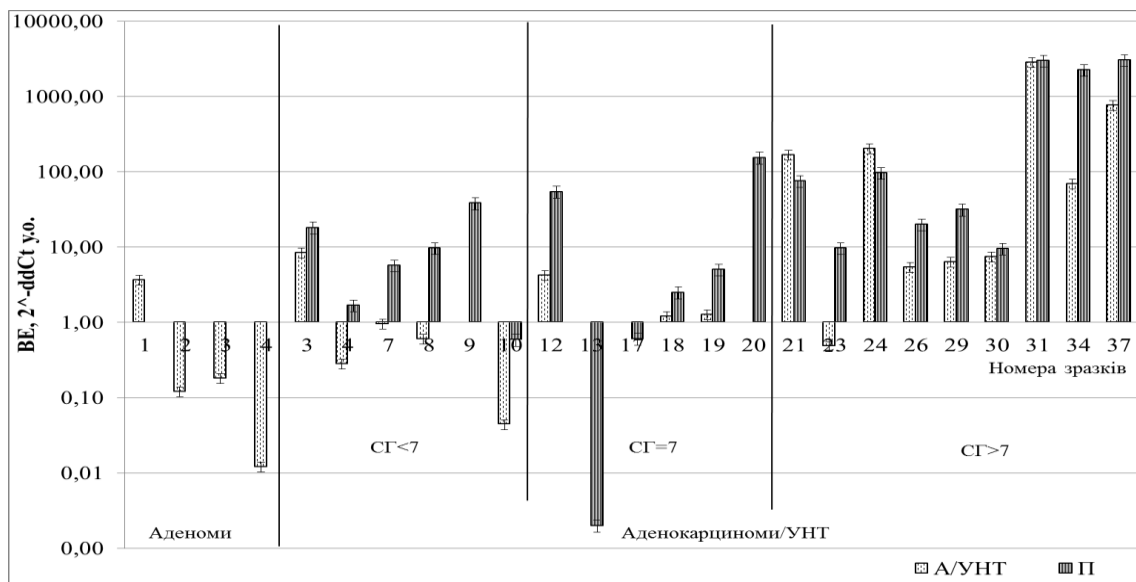


Рис. 3.27. Рівні BE гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* у аденокарциномах й парних УНТ та аденомах передміхурової залози

Наступний тест Дана-Бонфероні для множинних порівнянь підтвердив наявність статистично значущих відмінностей між групами. Хоч достовірних відмінностей BE ГТ між групами аденокарцином з різним СГ не виявлено, усі три групи аденокарцином з СГ<7, СГ=7, СГ>7 та одна група УНТ з СГ>7 мали значуще підвищення BE *TMPRSS2-ERG* у порівнянні з групою аденом ($p=0,04$; $p=0,04$; $p=0,01$; $p=0,012$ відповідно). Хоч значущого підвищення BE ГТ *TMPRSS2-ERG* у аденокарциномах СГ>7 у порівнянні з аденокарциномами СГ<7, СГ=7, не виявлено, але все ж тенденція спостерігається. Порівняння BE ГТ між аденокарциномами та УНТ виявило значущу різницю тільки між групами П та УНТ зі СГ<7 ($p=0,045$). Дві інші групи П СГ=7 та СГ>7 не мали різниці зі своїми УНТ, але мали значно вищі рівні BE у порівнянні з УНТ СГ<7 ($p=0,025$; $p=0,003$ відповідно). Крім того значне підвищення BE виявлено у П СГ>7 у порівнянні з УНТ СГ =7 ($p=0,03$). Серед груп УНТ з різним СГ виявлено різницю BE між УНТ СГ<7 та УНТ СГ>7 ($p=0,008$).

Для підтвердження відсутності хибно-позитивного результату в УНТ з експресією ГТ *TMPRSS2-ERG*, ми виділили ПЛР продукт та секвенували його. Це підтвердило наші результати наявності цього гібридного транскрипта в УНТ, як свідчать і дослідження інших вчених [697, 698]. Цей факт може

свідчити або про наявність пухлинних клітин в УНТ, або про те, що поява цього транскрипта відбувається на ранніх стадіях канцерогенезу і що УНТ у пацієнтів з пухлинами вже не є нормальною. Поява ГТ на ранніх стадіях підтверджує і факт наявності появи його вже у аденомах передміхурової залози.

Виявлений нами, ГТ *TMPRSS2-ERG* має онкогенний вплив на розвиток раку ПЗ, оскільки він потенційно може продукувати онкогенний білок ERG [697]. Цей білок бере участь у сигнальному шляху Wnt, який регулює транскрипцію генів, посилює проліферацію та міграцію клітин [699]. Є дані, що одна із його ізоформ може давати химерний білок, який здатний регулювати активність рецептора інсуліноподібного фактора росту-1. Він відіграє ключову роль у рості клітин і канцерогенезі та має підвищену експресію в більшості злоякісних пухлин, включаючи рак передміхурової залози. Крім того активація шляху передачі сигналу IGF1 – є важливим способом виживання клітин та може надавати селективну перевагу пухлинним клітинам [700]. Крім того, наші дані свідчать про формування ГТ *TMPRSS2-ERG* на ранніх стадіях канцерогенезу ПЗ. У майбутньому він може бути використаний при розробці методу ранньої діагностики та прогнозування перебігу захворювання, з урахуванням даних, отриманих в інших дослідженнях [684-694, 696-700].

Нещодавно продемонстровано зв'язок між експресією рецепторів андрогенів та ГТ *TMPRSS-ERG* при раку ПЗ. Вважають, що експресія цього транскрипта залежить від впливу андрогенів у гормонозалежних пухлинах [685, 686]. Відомо також, що експресія ГТ *TMPRSS2-ERG* пов'язана з сигнальними шляхами RAS / RAF та PI3K / PTEN / АКТ [701, 702].

Отже, виявлений гібридний транскрипт *TMPRSS-ERG* може бути одним з молекулярних факторів стратифікації пухлин ПЗ. Твін також може мати певні специфічні зв'язки та кореляції з іншими пухлино-асоційованими генами при раку передміхурової залози. Ці припущення ми зможемо перевірити після вивчення BE генів, що грають важливу роль при розвитку цього виду раку.

Добре відомі гени-супресори росту пухлин, які беруть участь у ЕМП при раку передміхурової залози, це *NKX3.1*, *PTEN* і *CDH1*. Незмінна активність та

висока експресія генів *NKX3-1* і *PTEN* є важливими факторами для нормального функціонування епітелійних клітин ПЗ [703]. E-кадгерин, кодований геном *CDH1*, є важливим білком що опосередковує тісні міжклітинні контакти та є одним з основних маркерів епітелійних клітин. Втрату його експресії пов'язують з прогресуванням та метастазуванням пухлин [704]. Інший білок, який відіграє вирішальну роль у підтримці бар'єрних властивостей тісного з'єднання епітелійних клітин, є Окклюдин (ген *OCLN*), який має антиметастатичні властивості [705].

Протилежна функція при раку ПЗ належить генам, які притаманні мезенхімним клітинам як, наприклад, N-кадгерин, кодований геном *CDH2*, фібронектин (*FNI*) і віментин (*VIM*). Білки, що кодуються цими генами є маркерами мезенхімних клітин, і підвищення їх експресії відповідає більш агресивному пухлинному фенотипу [706].

Металлопротеїнази супроводжують трансформацію і метастазування злоякісних клітин [707, 708]. Зокрема, експресія гена *MMP9* асоціюється з інвазивністю та метастатичними властивостями, інфільтрацією клітин, що підтримують пухлину, та посиленням ангиогенезу. Експресія гена *MMP2* збільшується при рості класу ТНМ пухлини та активації ангиогенезу.

Андрогеновий рецептор та його ізоформи є рецепторами стероїдних гормонів, які функціонують як фактори транскрипції. Існує перехресний взаємозв'язок між сигналігом AR та ЕМП. Відхилення в структурі та функції AR можуть викликати ЕМП при прогресуванні пухлин ПЗ [709].

Простато-специфічний антиген (PSA) є одним із найвідоміших маркерів раку ПЗ, кодується геном prostate-specific gene kallikrein 3, *KLK3*. PSA є нормальним антигеном ПЗ, але його експресія різко зростає при канцерогенезі ПЗ. Незважаючи на це, запалення, інфекція, травма та доброякісна гіперплазія ПЗ також є причиною підвищеного рівня PSA в сироватці крові. Тому скринінг на основі PSA для раку ПЗ страждає помилковими справами, в результаті чого позитивна прогностична цінність становить лише 25-40% [710].

Цитокератин 18 (*KRT18*) експресіється в нормальних люмінальних клітинах ПЗ. Він був гіперекспресований у низці злоякісних пухлин людини [711, 712]. У деяких випадках цей маркер використовується для оцінки стадії диференціювання пухлин. Ген *MKI67* кодує ядерний протеїн Ki67, маркер проліферації. Висока кореляція з клінічними показниками раку ПЗ була описана для протеїна Ki67 разом з іншим протеїном-маркером MIB-1 [713].

Після ініціації та прогресування раку очевидні відмінності властивостей між нормальною та пухлинною клітиною виявлені не тільки для проліферації та диференціювання, але й для процесу апоптозу. Ген *CASP3*, що кодує білок каспази 3, який є найбільш вивченим з ефекторних каспаз змінює експресію при прогресуванні пухлини у раку молочної та ПЗ [714, 715]. Ген *XIAP* (X-зв'язний інгібітор білка апоптозу) є членом сімейства протеїнів IAP, які спочатку були описані як інгібітори апоптозу. Деякі з членів сімейства можуть зв'язувати і нейтралізувати каспази. У раку ПЗ рівень експресії гена *XIAP* значно вище, ніж при інтраепітеліній неоплазії ПЗ [716].

Відомо, що процес ЕМП регулюється на різних етапах довгими некодувальними РНК (lncRNA) [717-719]. Одна з самих відомих простато-специфічних некодувальних РНК кодується геном *PCAZ*. Антиген 3 раку простати високо-експресований у тканинах раку ПЗ в порівнянні з нормальною тканиною передміхурової залози [717]. Накопичено багато доказів, що *PCAZ* також бере участь у сигналінгу AR. Висока експресія іншого гена, що кодує lncRNA *HOTAIR*, пов'язана з метастазуванням та поганим прогнозом у багатьох типах пухлин [718]. Ще один ген кодує lncRNA *SCHLAP1*, надмірно експресований у раку ПЗ. Рівень експресії гена *SCHLAP1* може передбачати поганий прогноз, включаючи метастазування та смертність від раку [719].

Загалом ми обрали 19 генів, асоційованих з ЕМП для встановлення їх експресії у аденокарциномах, УНТ та аденомах ПЗ. Для нормалізації експресії обрано 4 референсних гена *TBP*, *HPRT*, *ALAS1* та *TUBA1B* [671, 676, 681]. Згідно статистичному аналізу, ВЕ генів в аденомах не мала нормального розподілу, тому надалі ми використовували непараметричні методи та тести

для статистичної обробки даних. Патерни ВЕ досліджуваних генів у зразках аденокарцином, парних УНТ та аденом ПЗ наведено на рис. 3.28. – 3.34.

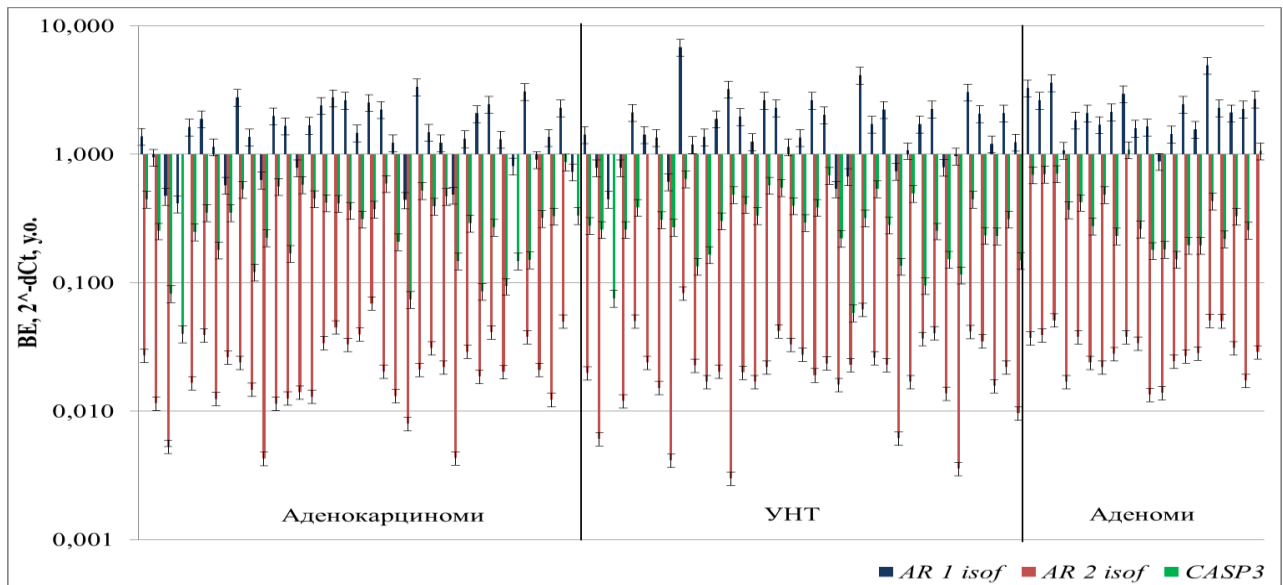


Рис. 3.28. Патерни ВЕ генів *AR* (1 та 2 ізоформи) та *CASP3* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

У дослідженні використано 37 аденокарцином, парних УНТ з різними стадіями, СГ та 20 аденом. З 37 аденокарцином 11 разків П мали СГ<7, 9 П були зі СГ=7, та 17 П з СГ>7. На рисунках з патернами ВЕ досліджуваних генів П та УНТ розташовані у порядку зростання СГ. З 37 аденокарцином 22 П були

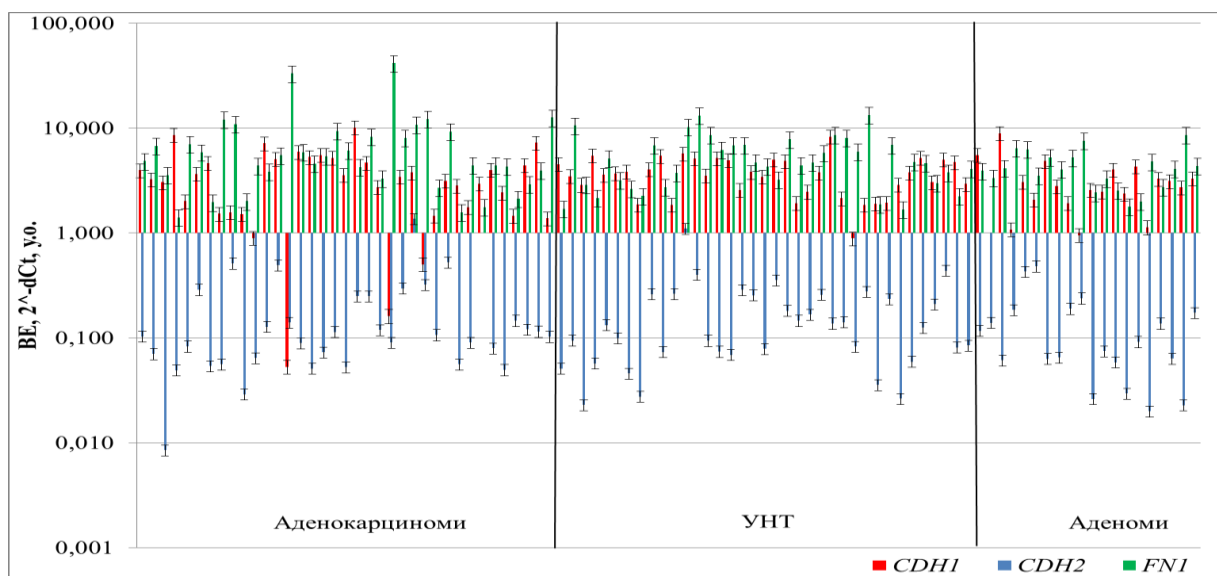


Рис. 3.29. Патерни ВЕ генів *CDH1*, *CDH2* та *FN1* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

1-2 стадії та 17 П 3-4 стадії. Аналіз ВЕ демонструє досить високі рівні дисперсії, особливо у групі аденокарцином [720].

З 19 генів, асоційованих з ЕМП їх ВЕ можна охарактеризувати як мінімум трьома рівнями по переважній кількості зразків: високо-експресовані гени

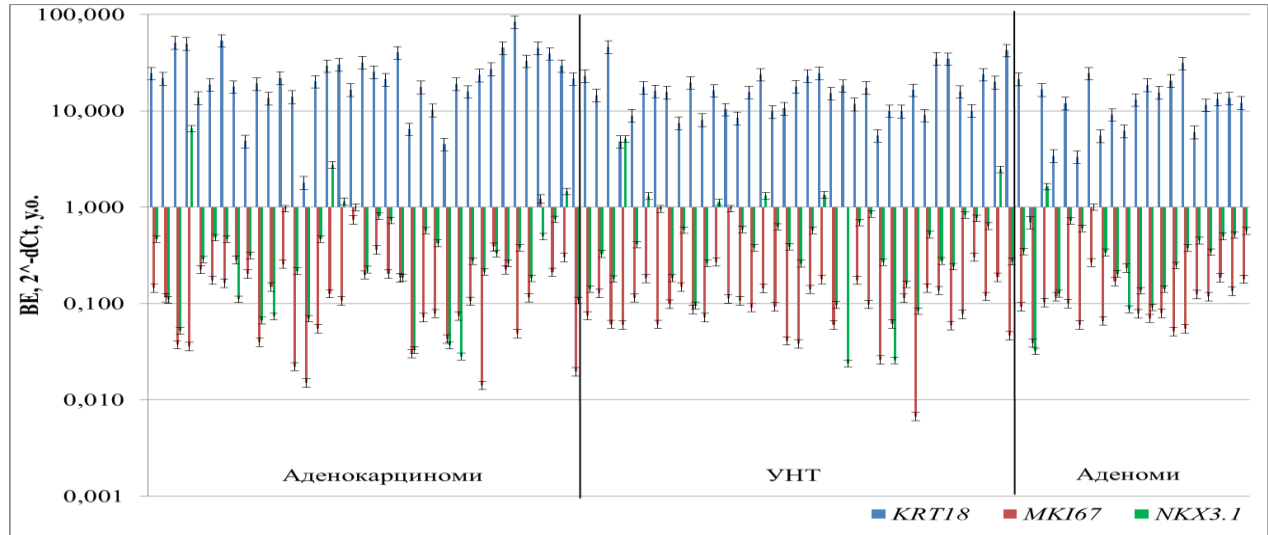


Рис. 3.30. Патерни ВЕ генів *KRT18*, *MKI67* та *NKX3.1* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози.

(*PSA*, *PTEN*, *FN1*, *VIM*, *KRT18*, *MMP2*), середньоекспресовані гени (*AR* 1 ізоформа, *CDH1*, *NKX3.1*, *OCLN*, *PCA3*, *CASP3*, *MMP2*, *MMP9* *XIAP*) та низько-експресовані гени (*AR* 2 ізоформа, *CDH2*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*).

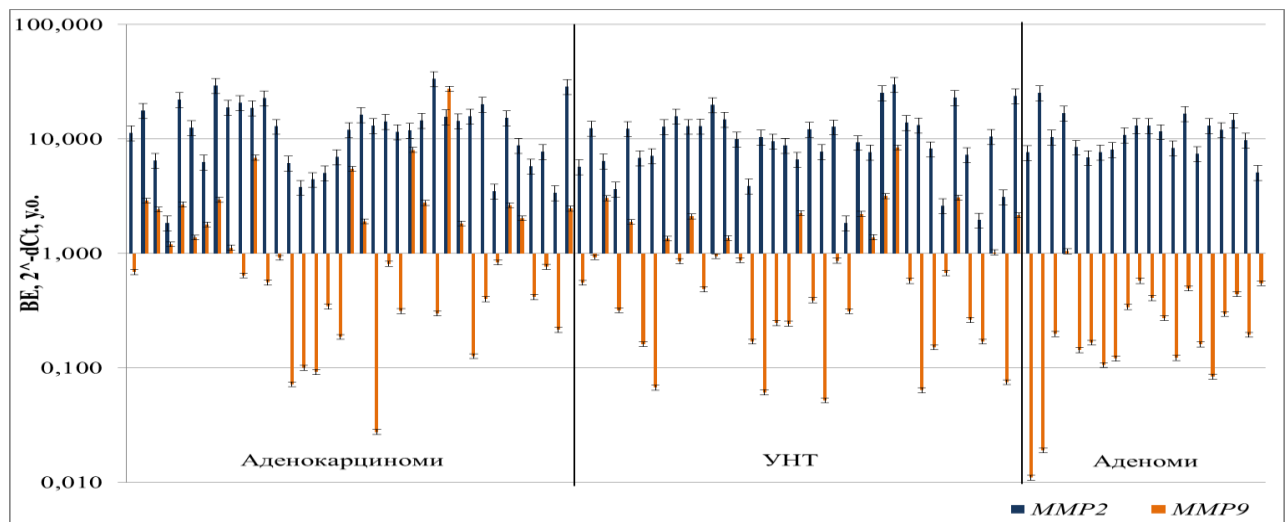


Рис. 3.31. Патерни ВЕ генів *MMP2* та *MMP9* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Статистичний аналіз парних зразків П/УНТ за парним тестом Вілкоксона з поправкою на множинні порівняння $FDR=0,1$ показав наявність значущих відмінностей ВЕ для шести генів (табл. 3.21): *KRT18*, *MKI67*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*, *HOTAIR*. Причому ВЕ у групі П була підвищена у порівнянні з УНТ для

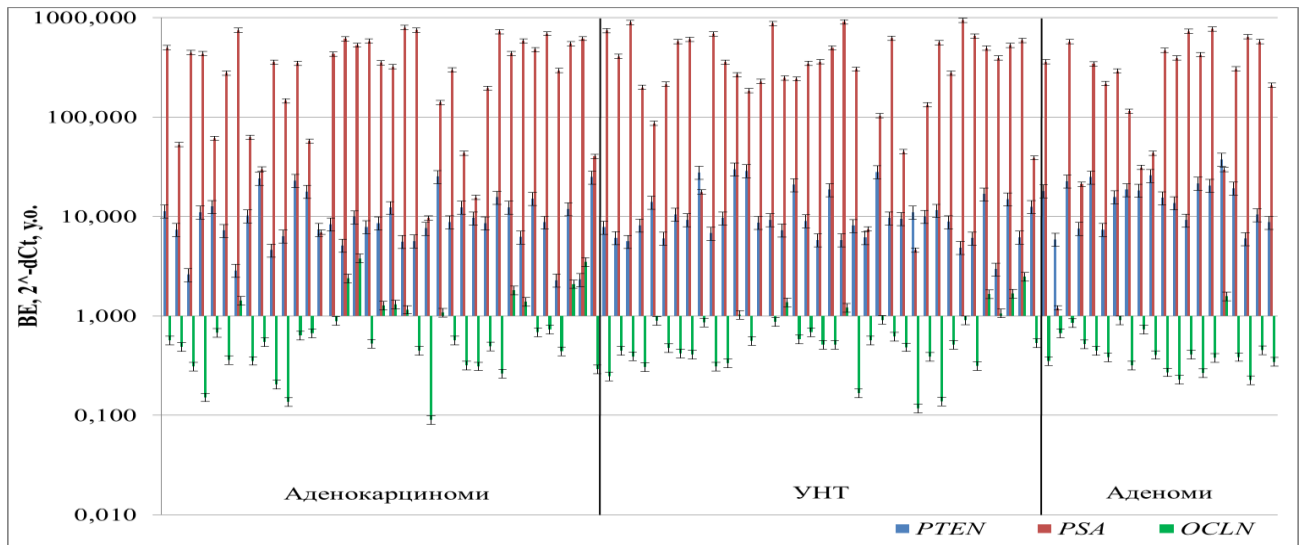


Рис. 3.32. Патерни ВЕ генів *PTEN*, *PSA* та *OCLN* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

всіх перелічених генів. Згідно даних літератури для цих генів підвищення експресії у пухлинах ПЗ є очікуваним, так підвищення ВЕ *KRT18*, *MKI67* свідчить про посилену проліферацію клітин пухлинах [711, 713], а збільшення експресії *MMP2*, *MMP9* та *VIM* про більшу рухливість клітин та посилення

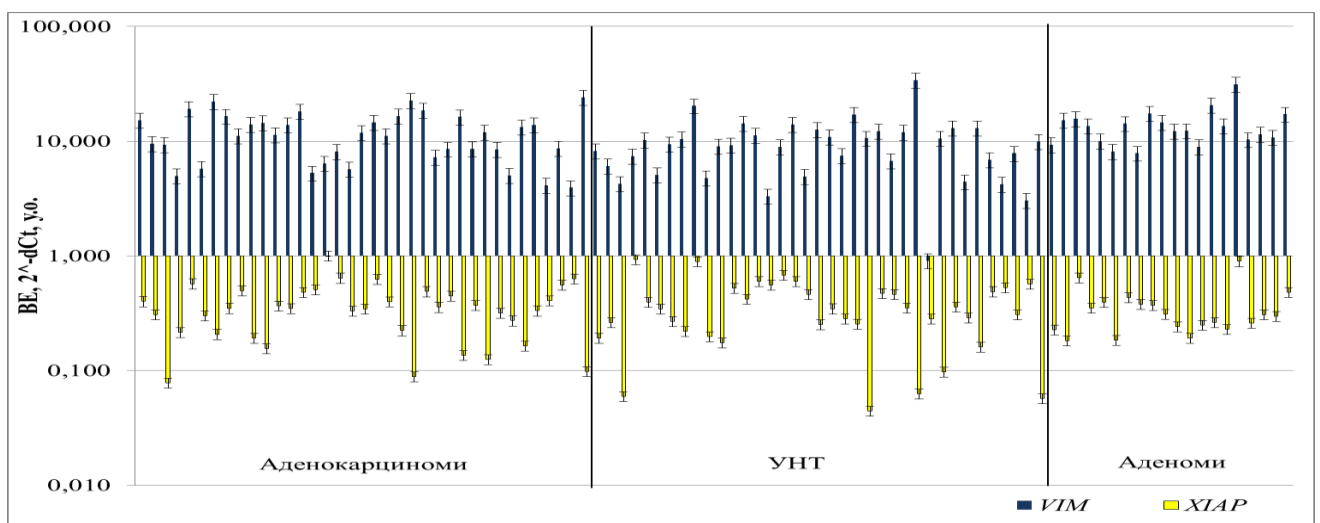


Рис. 3.33. Патерни ВЕ генів *VIM* та *XIAP* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

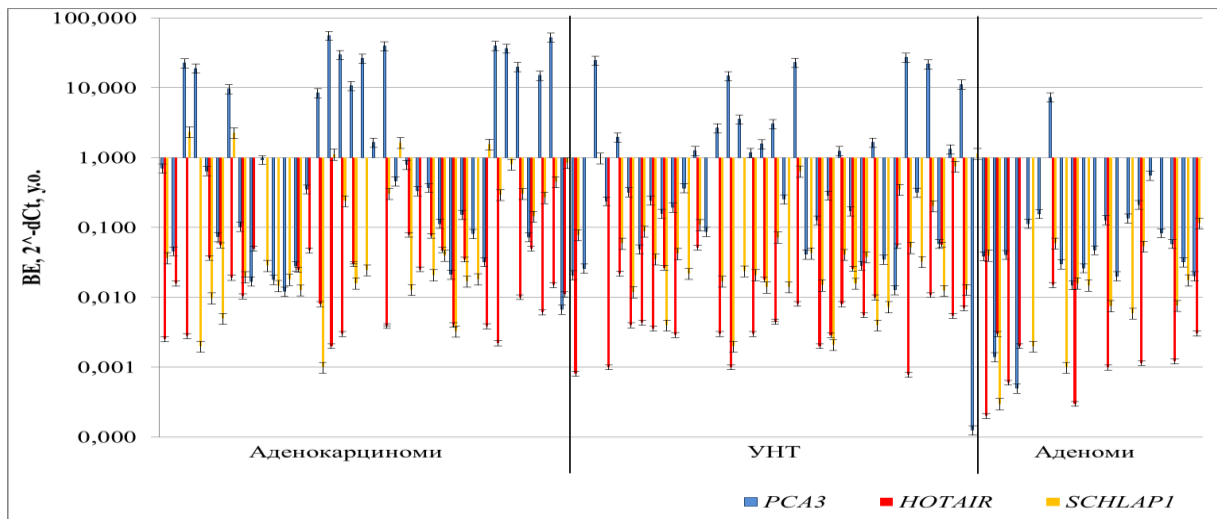


Рис. 3.34. Патерни BE генів lncRNA: *PCA3*, *HOTAIR* та *SCHLAP1* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

процесів ЕМП [706, 707]. Підвищення BE *HOTAIR*, пов'язують з активізацією процесів метастазування у пухлинах [718].

Таблиця 3.21.

Відмінності BE генів між парними зразками П/УНТ

Ген	p-рівні &	Ген	p-рівні &
<i>KRT18</i>	0,0004	<i>MMP9</i>	0,0136
<i>MKI67</i>	0,0168	<i>VIM</i>	0,0097
<i>MMP2</i>	0,0106	<i>HOTAIR</i>	0,0065

Примітка. & - парний тест Вілкоксона з FDR=0,15

Аналіз BE досліджуваних генів у трьох групах зразків: П, УНТ, А показав наявність статистично значущих відмінностей. Дані описової статистики наведено у табл. 3.22. За даними тесту Краскела-Уолліса з поправкою на множинні порівняння (FDR=0,1) 9 генів: *AR* (1 isof), *AR* (2 isof), *PTEN*, *VIM*, *MMP9*, *KRT18*, *PCA3*, *HOTAIR* та *SCHLAP1* мають статистично значущі відмінності BE між групами зразків. Треба відмітити високий рівень дисперсії даних BE, який не дає змоги виявити відмінності для іншої половини генів. Згідно тесту Дана-Бонферроні у цих 9-и генів виявлено 15 пар груп зразків, що мають значущі різниці BE ($p < 0,05$) (табл. 3.23). Так, гени *AR* (1 isof), *AR* (2 isof) і *PTEN* мають найвищі рівні BE у групах аденом, тоді як групи аденокарцином

Таблиця 3.22.

Дані описової статистики ВЕ у групах П, Н та А ПЗ

Гени	Група	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
<i>AR (1 isof)</i>	П	1,377	0,911	2,228	0,017
	Н	1,428	1,069	2,119	
	А	2,129	1,623	2,672	
<i>AR (2 isof)</i>	П	0,020	0,012	0,033	0,031
	Н	0,022	0,015	0,028	
	А	0,029	0,023	0,038	
<i>CASP3</i>	П	0,318	0,170	0,419	
	Н	0,288	0,194	0,402	
	А	0,303	0,207	0,587	
<i>CDH1</i>	П	3,237	1,572	4,676	
	Н	3,707	2,562	4,942	
	А	2,752	2,001	3,661	
<i>CDH2</i>	П	0,103	0,056	0,146	
	Н	0,125	0,073	0,255	
	А	0,083	0,060	0,178	
<i>FNI</i>	П	4,840	3,557	8,230	
	Н	4,706	2,987	6,879	
	А	4,051	3,017	5,234	
<i>KRT18</i>	П	21,740	16,570	31,828	0,0004
	Н	15,868	9,987	19,905	
	А	12,631	6,102	17,625	
<i>MKI67</i>	П	0,127	0,049	0,212	
	Н	0,098	0,061	0,141	
	А	0,102	0,068	0,152	
<i>MMP2</i>	П	12,894	6,501	17,772	
	Н	9,950	6,825	12,982	
	А	10,628	7,863	13,108	
<i>MMP9</i>	П	0,918	0,345	2,466	0,001
	Н	0,674	0,243	1,385	
	А	0,196	0,122	0,424	
<i>NKX3-1</i>	П	0,314	0,110	0,571	
	Н	0,410	0,242	0,828	
	А	0,344	0,139	0,543	
<i>OCLN</i>	П	0,568	0,336	1,214	
	Н	0,524	0,391	0,900	
	А	0,396	0,332	0,593	
<i>PSA</i>	П	351,254	62,441	547,561	
	Н	355,608	198,460	590,290	
	А	323,470	78,968	520,212	

Продовж. табл. 3.22.

Гени	Група	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
<i>PTEN</i>	П	8,762	6,354	12,322	0,015
	Н	9,262	6,185	12,558	
	А	16,989	8,964	22,065	
<i>VIM</i>	П	11,352	8,120	15,202	0,007
	Н	9,253	6,056	12,017	
	А	12,947	10,163	15,474	
<i>XIAP</i>	П	0,349	0,215	0,479	
	Н	0,344	0,219	0,488	
	А	0,301	0,235	0,386	
<i>PCAZ[#]</i>	П	0,647	0,074	19,017	0,001
	Н	0,318	0,088	1,970	
	А	0,044	0,023	0,132	
<i>HOTAIR[#]</i>	П	0,015	0,004	0,037	0,0004
	Н	0,004	0,001	0,011	
	А	0,001	0,000	0,003	
<i>SCHLAP1[#]</i>	П	0,029	0,015	0,307	0,017
	Н	0,032	0,013	0,079	
	А	0,008	0,002	0,018	

Примітки: 1. * - Статистично значущі відмінності згідно тесту Краскела-Уолліса з FDR=0,1; 2. # - lncRNA

мають значно знижені ВЕ ($p = 0,021$; $p = 0,047$; $p = 0,015$, відповідно). Подібні значущі зміни ВЕ спостерігались також для групи аденом та УНТ передміхурової залози для генів *AR* (1 isof) та *PTEN* ($p = 0,045$; $p = 0,047$). ВЕ гена *VIM* була найвищою також у аденомах і показала суттєві відмінності у порівнянні з групою УНТ ($p = 0,007$), тоді як ніяких відмінностей ВЕ з групою аденокарцином не виявлено. Протилежна ситуація спостерігалася для ВЕ генів *MMP9*, *PCAZ* та *SCHLAP1* в аденомах. Вони показали найнижчі рівні, тоді як ВЕ у групах аденокарцином була значно підвищеною ($p = 0,0001$; $p = 0,001$; $p = 0,013$, відповідно) та в групах УНТ – для генів *MMP9* ($p = 0,015$) та *PCAZ* ($p = 0,006$). ВЕ генів *KRT18* і *HOTAIR* продемонстрували аналогічну тенденцію змін.

Найвищі рівні ВЕ спостерігались у групах аденокарцином, ці рівні значуще відрізнялися як від УНТ ($p = 0,018$; $p = 0,047$; відповідно), так і з аденомами ($p = 0,001$, $p = 0,0001$), які показали найнижчі рівні ВЕ. Тільки гени

KRT18 та *HOTAIR* мали відмінності рівнів ВЕ між групами аденокарцином та УНТ, за даними тесту Дана-Бонферроні. Тоді як результати парного аналізу П/УНТ свідчать про наявність різниці ВЕ між цими групами у 6-и генів. Тобто, крім *KRT18* та *HOTAIR*, які мають достовірні різниці за обома тестами, ще гени *MKI67*, *MMP2*, *MMP9*, *VIM*. Причиною цих відмінностей можуть бути методи статистичного аналізу, тобто алгоритм методу та чутливість. Отже, необхідний подальший аналіз цих відмінностей.

Групування зразків пухлин згідно їх КПХ та пошук відмінностей ВЕ генів у цих групах зразків може дати уявлення про вплив канцерогенних процесів на експресію генів та розкрити можливі механізми прогресування пухлин. Один з важливих КПХ є стадії захворювання. Ми згрупували всі зразки раку ПЗ та відповідних УНТ у дві групи: 1-2 стадія (22 зразка) та 3-4 стадії (15 зразків).

Після аналізу ВЕ досліджуваних генів за даними тесту Краскела-Уолліса з FDR=0,1 виявлено 6 генів (*KRT18*, *MMP9*, *VIM*, *PCAZ*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*) зі статистично значущими відмінностями ВЕ у цих експериментальних групах.

Таблиця 3.23.

Відмінності ВЕ у парах груп аденокарцином (П), УНТ (Н) та аденом (А) ПЗ

Гени	Пари з відмінностями	p-рівні **
<i>AR(1isof)</i>	П/А	0,021
	Н/А	0,045
<i>AR (2isof)</i>	П/А	0,047
<i>KRT18</i>	П/А	0,001
	П/Н	0,018
<i>MMP9</i>	П/А	0,000
	Н/А	0,015
<i>PTEN</i>	П/А	0,015
	Н/А	0,047
<i>VIM</i>	Н/А	0,007
<i>PCAZ</i> [#]	П/А	0,001
	Н/А	0,006
<i>HOTAIR</i> [#]	П/А	0,000
	П/Н	0,047
<i>SCHLAP1</i> [#]	П/А	0,013

Примітки: 1. ** - Статистично значущі відмінності за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь; 2. # - lncRNA; 3. 0,000 – p<0,001

Дані описової статистики для цих генів наведено у додатку И. Всі ці гени показали аналогічні тенденції змін ВЕ, як в раніше проаналізованих трьох групах (ПНА). Серед цих генів - 3 гена, що кодують білки: *KRT18*, *MMP9* і *VIM*, та 3 гени довгих некодувальних РНК: *PCAZ*, *HOTAIR*, *SCHLAPI*. За результатами тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь виявлено 11 пар груп зразків із значущими відмінностями ВЕ (табл. 3.24).

П'ять з шести генів мають статистично значуще підвищення ВЕ у групах аденокарцином різних стадій у порівнянні з групою аденом. Тільки ген *VIM* є виключенням і має відмінності ВЕ тільки між групами УНТ 1-2 стадії та аденомами. Жодної значущої різниці ВЕ між аденокарциномами різних стадій та аденокарциномами й УНТ при даному групуванні зразків не виявлено.

Наступна важлива для діагностики та прогнозу раку ПЗ КПХ, яка характеризує диференціацію ракових клітин та агресивність є сума за шкалою Глісона. Три параметра СГ використано для групування зразків

Таблиця 3.24.

Відмінності ВЕ у парах груп П з різними стадіями, Н та аденом А ПЗ

Гени	Пари груп зразків зі змінами	р-рівні **
<i>KRT18</i>	П (3-4 ст)/А	0,0015
	П (3-4 ст)/Н (1-2 ст)	0,0269
<i>MMP9</i>	П (1-2 ст)/А	0,0115
	П (3-4 ст)/А	0,0056
<i>VIM</i>	Н (1-2 ст)/А	0,012
<i>PCAZ</i>	П (1-2 ст)/А	0,0265
	П (3-4 ст)/А	0,0134
	Н (1-2 ст)/А	0,0123
<i>HOTAIR</i>	П (1-2 ст)/А	0,0009
	П (3-4 ст)/А	0,0164
<i>SCHLAPI</i>	П (3-4 ст)/А	0,0052

Примітка. ** - статистично значущі відмінності за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

аденокарцином та УНТ: СГ<7 (11 зразків), СГ=7 (9 зразків), СГ>7 (17 зразків). Крім того, для порівняння ВЕ використовували і групу аденом. Отже, аналіз ВЕ

досліджуваних генів серед 7 груп зразків з урахуванням різних СГ виявив 10 генів (*AR* (1 isof), *CASP3*, *CDH1*, *KRT18*, *MMP9*, *OCLN*, *XIAP*, *PCAZ*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*), які мали статистично значущі зміни за даними тесту Краскела-Уолліса з $FDR=0,1$. Дані описової статистики цих генів наведено у додатку К. Якщо порівняти дані з попередніми типами групування зразків, то з ПНА групуванням співпадають зміни ВЕ 6 з 10 генів, а з групуванням з урахуванням різних стадій – 5 генів. Тобто при кожному типі групування з'являються відмінності у ВЕ досліджуваних генів, що може корелювати з тими ознаками, за якими згруповано зразки.

Проведення наступного тесту Дана-Бонфероні (табл. 3.25) показало наявність значущих відмінностей ВЕ між 12 парами груп зразків лише для 8 з 10 генів, що мали значущі зміни між групами за тестом Краскела-Уолліса. Відомо, що тест Дана-Бонфероні є більш суворим у порівнянні з тестом Краскела-Уолліса та потребує більших різниць та менших дисперсій даних між групами для отримання статистично значущих відмінностей.

Таблиця 3.25.

Значущі відмінності ВЕ досліджуваних генів у парах груп аденокарцином, УНТ з різними СГ та аденом передміхурової залози

Гени	Пари груп зі змінами	р-рівень **
<i>AR</i> (1isof)	П СГ<7/А	0,028
<i>CDH1</i>	П СГ=7/П СГ>7	0,041
<i>KRT18</i>	П СГ>7/А	0,018
<i>MMP9</i>	П СГ<7/А	0,000
	П СГ>7/А	0,043
<i>OCLN</i>	П СГ=7/А	0,033
	П СГ<7/П СГ=7	0,049
<i>PCAZ</i>	П СГ=7/А	0,027
	Н СГ=7/А	0,021
<i>HOTAIR</i>	П СГ<7/А	0,033
	П СГ>7/А	0,005
<i>SCHLAP1</i>	П СГ>7/А	0,024

Примітка: ** - Статистично значущі відмінності за тестом Дана-Бонфероні для множинних порівнянь

Два гени, що не мали значущих різниць між групами за тестом Дана-Бонфероні – це *CASP3* та *XIAP*. Вони обидва мають при групуванні за СГ різні рівні експресії як у пухлинах, так і УНТ з різними СГ, але висока дисперсія ВЕ та невеликий об'єм вибірки не дають можливості виявити значущі відмінності ВЕ генів за тестом Дана-Бонфероні для множинних порівнянь, тоді як все ж тенденція до цих змін ВЕ у обох генах існує і потребує досліджень на більшій вибірці зразків. Серед значущих змін ВЕ 8-и генів для 7-и генів виявлено відмінності між П з різними СГ та аденомами. Крім того, для 6-и з цих генів, а саме *KRT18*, *MMP9*, *OCLN*, *PCAZ*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*, спостерігається значуще ($p < 0,05$) підвищення ВЕ у групах П з різними СГ у порівнянні з аденомами, тоді як для гена *AR* (1 isof) виявлено значуще зниження ВЕ у П СГ < 7 у порівнянні з аденомами. Два гени *CDH1* та *OCLN* мають значущі відмінності ВЕ між групами аденокарцином з різним СГ. Ген *CDH1* має значуще підвищення ВЕ у П СГ = 7 у порівнянні з П СГ > 7 ($p = 0,041$), а ген *OCLN* має значуще підвищення ВЕ у П СГ = 7 у порівнянні з П СГ < 7 ($p = 0,049$). Жодних відмінностей ВЕ між аденокарциномами та УНТ не виявлено, тоді як для гена *PCAZ* знайдено підвищення ВЕ у Н СГ = 7 у порівнянні з аденомами ($p = 0,021$).

Слід відмітити, що зміни ВЕ у групах УНТ мали ті ж напрямлення змін, що й у групах аденокарцином з різними СГ. Однак статистичних відмінностей у більшості УНТ у порівнянні з аденомами не виявлено.

Отже вивчення ВЕ генів, які приймають участь у ЕМП у пухлинах, УНТ та аденомах передміхурової залози виявило зміни ВЕ у низці генів (табл. 3.26) як при групуванні на 3 групи зразків (ПНА), так с при врахуванні стадій та СГ. Виявлено 5 генів (*KRT18*, *MMP9*, *PCAZ*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*), які мають зміни у всіх трьох типах групувань. Ген *PTEN* мав зміни тільки при ПНА типі групування, а зміни ВЕ у *CDH1* та *OCLN* з'являлись лише при врахуванні СГ. Встановлення кореляцій між ВЕ генів у групі аденокарцином та клініко-патологічними показниками дасть можливість виявити важливі взаємозв'язки та підтвердити механізми, або виявити нові ланки канцерогенезу, як і знайти потенційні онкологічні біомаркери.

Таблиця 3.26.

Зведені дані ЕМП-пов'язаних генів, що мають значущі зміни ВЕ при різних типах групування зразків ПЗ

ПНА	ПНА+стадії	ПНА+СГ
<i>AR(1isof)</i>		<i>AR (1isof)</i>
<i>AR (2isof)</i>		
		<i>CDH1</i>
<i>KRT18</i>	<i>KRT18</i>	<i>KRT18</i>
<i>MMP9</i>	<i>MMP9</i>	<i>MMP9</i>
		<i>OCLN</i>
<i>PTEN</i>		
<i>VIM</i>	<i>VIM</i>	
<i>PCA3</i>	<i>PCA3</i>	<i>PCA3</i>
<i>HOTAIR</i>	<i>HOTAIR</i>	<i>HOTAIR</i>
<i>SCHLAP1</i>	<i>SCHLAP1</i>	<i>SCHLAP1</i>

Примітка. жирним шрифтом – гени, що мають зміни ВЕ у всіх трьох групуваннях

Встановлення коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом у аденокарциномах ПЗ виявило низку значущих кореляцій між ВЕ досліджуваних генів та КПХ. Дані статистичного тесту наведено у табл. 3.27.

Серед досліджуваних генів кореляцію з СГ у аденокарциномах ПЗ має тільки ген *CDH2* ($r^s=0,338$; $p<0,05$), тоді як зі стадією захворювання мають значущі кореляції 6 генів: *CDH1* ($r^s=-0,385$; $p<0,05$), *AR* (1 isof), *AR* (2 isof) ($r^s=-0,381$; $r^s=-0,390$, відповідно $p<0,05$), *OCLN* ($r^s=-0,360$; $p<0,05$), *NKX3-1* ($r^s=-0,353$; $p<0,05$) та *XIAP* ($r^s=-0,352$; $p<0,05$). Всі кореляції є негативними, тобто при збільшенні стадії захворювання експресія цих генів має знижуватись [720]. Більшість цих генів є маркерами епітелійних клітин, які дійсно знижують експресію при прогресуванні раку [383, 384, 390].

Для двох останніх КПХ – рівень ПСА у крові та вік пацієнтів виявлено лише по одній значущій кореляції, причому з одним і тим же геном *SCHLAP1*. Він має позитивну кореляцію з рівнем ПСА ($r^s=0,436$; $p<0,01$), та негативну кореляцію з віком ($r^s=-0,376$; $p<0,05$).

Таблиця 3.27.

**Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) ВЕ досліджуваних генів й
КПХ у аденокарциномах ПЗ**

КПХ/ гени	<i>AR</i> (1 isof)	<i>AR</i> (2 isof)	<i>CDH1</i>	<i>CDH2</i>	<i>FN1</i>	<i>VIM</i>	<i>OCNL</i>	<i>MMP2</i>	<i>MMP9</i>	<i>NKX3-1</i>
СГ	0,023	0,033	-0,171	0,338	0,072	-0,076	0,127	-0,057	-0,135	-0,052
Стадія	-0,381	-0,390	-0,385	0,181	0,184	0,247	-0,360	0,151	0,140	-0,353
ПСА нг/мл	-0,147	-0,097	-0,233	-0,026	0,065	0,087	-0,011	0,080	-0,069	-0,263
Вік	-0,154	-0,069	-0,001	0,066	0,213	-0,224	-0,071	-0,058	-0,029	0,085

КПХ/ гени	<i>PCSA3</i>	<i>PSA</i>	<i>KRT18</i>	<i>MKI67</i>	<i>CASP3</i>	<i>XIAP</i>	<i>PTEN</i>	<i>HOTAIR</i>	<i>SCHLAP1</i>
СГ	0,013	0,055	0,039	-0,016	0,049	0,026	0,102	0,101	0,189
Стадія	-0,128	-0,305	-0,052	-0,276	-0,126	-0,352	0,092	0,223	-0,006
ПСА нг/мл	0,127	0,072	0,107	0,029	-0,046	-0,046	-0,270	0,003	0,436
Вік	-0,151	-0,300	-0,208	0,053	0,145	0,154	-0,007	0,177	-0,376

Примітки: 1. $p < 0,05$ – курсив; 2. $p < 0,01$ – жирний курсив

Крім того, ми встановили показники коефіцієнтів кореляції між досліджуваними генами (додаток Л). Треба відмітити, що вони мають більшу значущість у порівнянні з КПХ.

Найбільші показники r^s , що знаходяться у межах $|0,603-0,817|$ з дуже високим значенням $p < 0,0001$ мають 10 кореляцій між досліджуваними генами. Найвище значення $r^s = 0,817$ для ВЕ генів *NKX3-1* з *CDH1*, $r^s = 0,754$ мають ВЕ генів *CASP3* з *XIAP*, а найвищу негативну кореляцію з $r^s = -0,724$ мають гени *KRT18* з *FN1*. Найбільша кількість максимальних кореляцій мають гени *OCNL* з *AR* (1 isof), *NKX3-1*, *XIAP*.

Крім того, ми виявили 44 кореляції між дослідженими генами r^s у межах $|0,402-0,652|$ з значеннями $p < 0,01$ та 23 кореляції з r^s у межах $|0,338-0,422|$ зі значенням $p < 0,05$. Велика кількість кореляцій між ВЕ генів свідчить про тісний взаємозв'язок молекулярних мереж та канцерогенних процесів, в яких беруть участь досліджені гени.

3.4.3. Встановлення та аналіз рівнів ВЕ генів, асоційованих з раком передміхурової залози: рецепторів стероїдних та білкових гормонів, факторів росту та простато-специфічних протеїнів. Однією з важливих характеристик нормального функціонування епітелійних клітин передміхурової залози є чутливість до стероїдних та пептидних гормонів, факторів росту та активність метаболічних ензимів. У процесі пухлинної трансформації клітини часто втрачають чутливість до гормонів і факторів росту, а також змінюють свій метаболізм. *AR* є ключовим елементом як функціонування нормальної передміхурової залози, так і є учасником безпосередньо злоякісної трансформації клітин ПЗ. Як вже відомо, сигналінг *AR* відіграє першорядну роль у прогресуванні андроген-чутливого раку та розвитку андроген-резистентного й кастрат-резистентного раку ПЗ [721]. Встановлено кілька ізоформ *AR*. Деякі з них є простато-специфічними. Експресія *AR* змінюється у процесі прогресії раку передміхурової залози. Підвищення експресії *AR* - ізоформи А (1 ізоф) зменшує проліферацію, але прискорює вторгнення ракових клітин передміхурової залози у порівнянні з підвищенням експресії *AR*-ізоформи В (2 ізоформи) [722, 723]. Також є припущення та експериментальні дані щодо впливу андрогенів та андрогенового рецептора на процес формування злиття між *TMPRSS2* та *ERG* [724, 725]. Але, поряд з тим, функціонування інших гормональних систем (як стероїдних гормонів, так і пептидних гормонів) вносять свій вклад у процеси прогресії раку [700, 726-729].

Нами відібрано 14 транскриптів (10 генів), що представляють рецептори стероїдних та пептидних гормонів, факторів росту та метаболічні ферменти для встановлення їх ВЕ у аденокарциномах, УНТ та аденомах передміхурової залози [730]. Патерни ВЕ досліджуваних генів наведено на рис. 3.35.-3.40.

Обидва естрогенові рецептори, альфа (*ESRα*, *ESR1*) і бета (*ESRβ*, *ESR2*), пов'язані з розвитком раку ПЗ [731]. Показано, що підвищена експресія *ESRα* спостерігається при прогресуванні, метастазуванні та андроген-резистентному фенотипі; *ESRα* задіяний в регуляції експресії ГТ *TMPRSS2-ERG* [727].

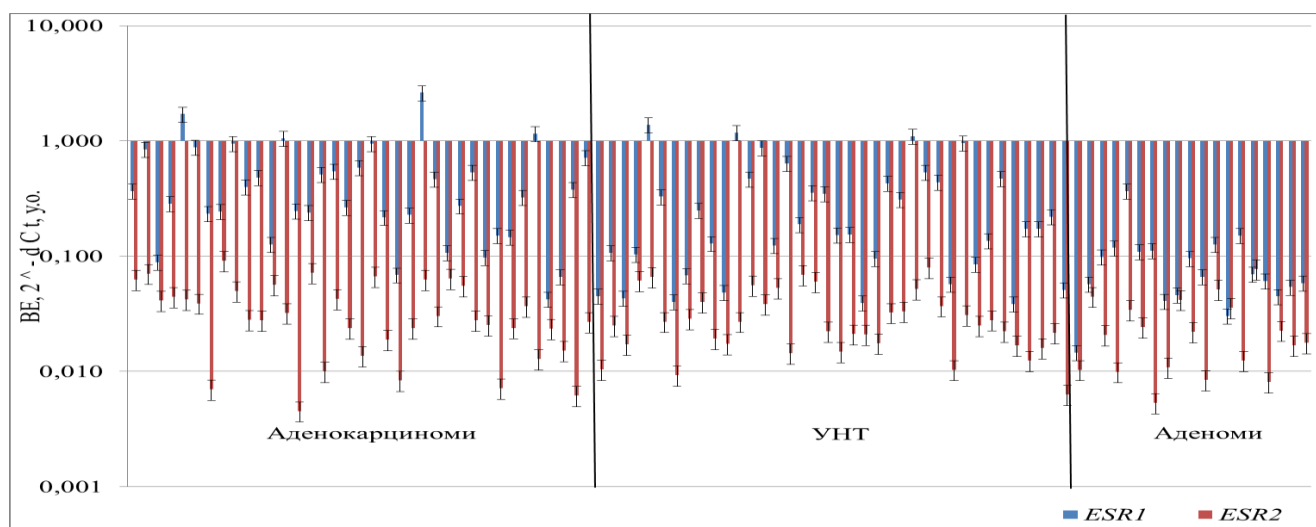


Рис. 3.35. Патерни BE генів *ESR1* та *ESR2* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Слід відмітити, що наступний вид стероїдних рецепторів – глюкокортикоїдний рецептор – GCR (кодується геном *NR3C1*) поділяє з *AR* кілька транскрипційних мішеней [732]. Він має три ізоформи GCR (альфа (A), бета (B) і гамма (G)), які є дуже важливими для прогресування раку ПЗ [733].

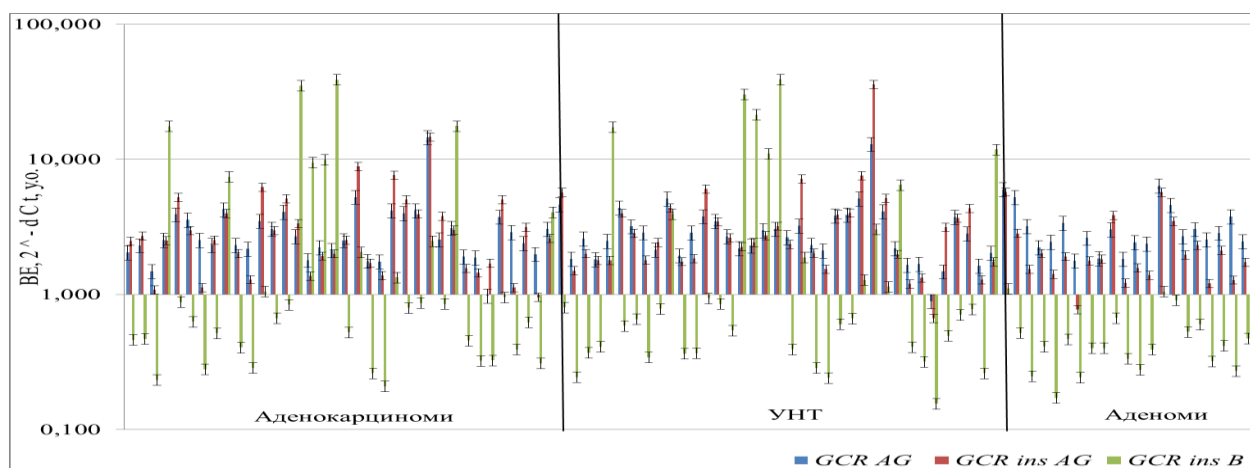


Рис. 3.36. Патерни BE нормальних ізоформ гена *GCR* (A, B, G) та з інерцією (*ins*) у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

При ініціації, а також при прогресуванні раку передміхурової залози важливу роль відіграють білкові та пептидні гормони. Так, білки, що кодуються геном *INSR* (рецептор інсуліну) - (підтипи *INSRA* і *INSRB*) опосередковують

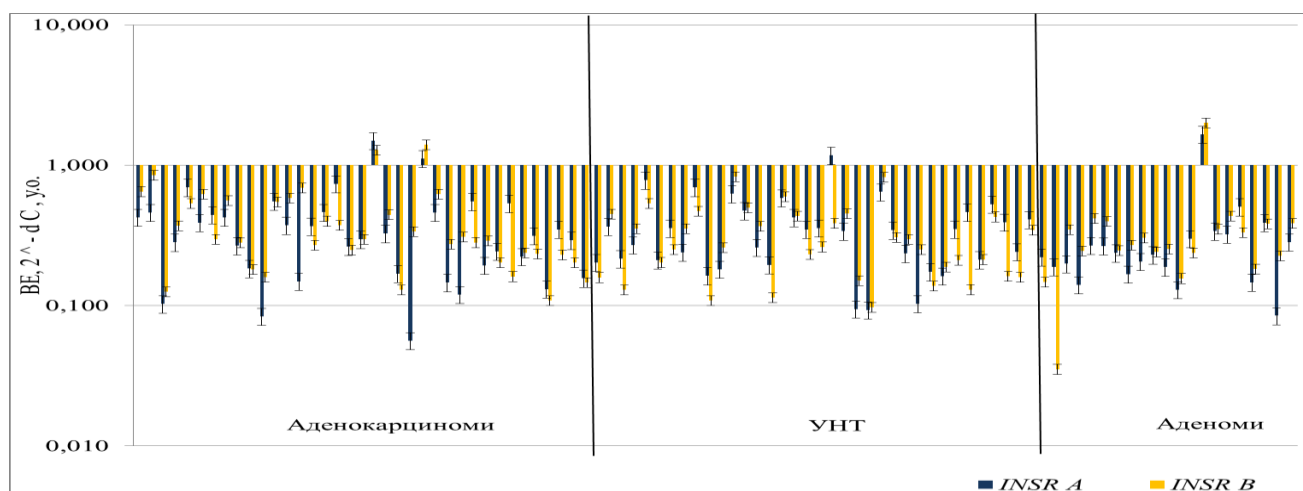


Рис. 3.37. Патерни BE двох ізоформ гена *INSR* (*INSRA* та *INSRB*) у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

ріст пухлин, міграцію клітин та приймають участь у ангіогенезі [726]. Подібні функції здійснюються й завдяки мережі рецепторів інсулінового фактору росту IGF, в тому числі IGF1R та IGF2R [700, 734].

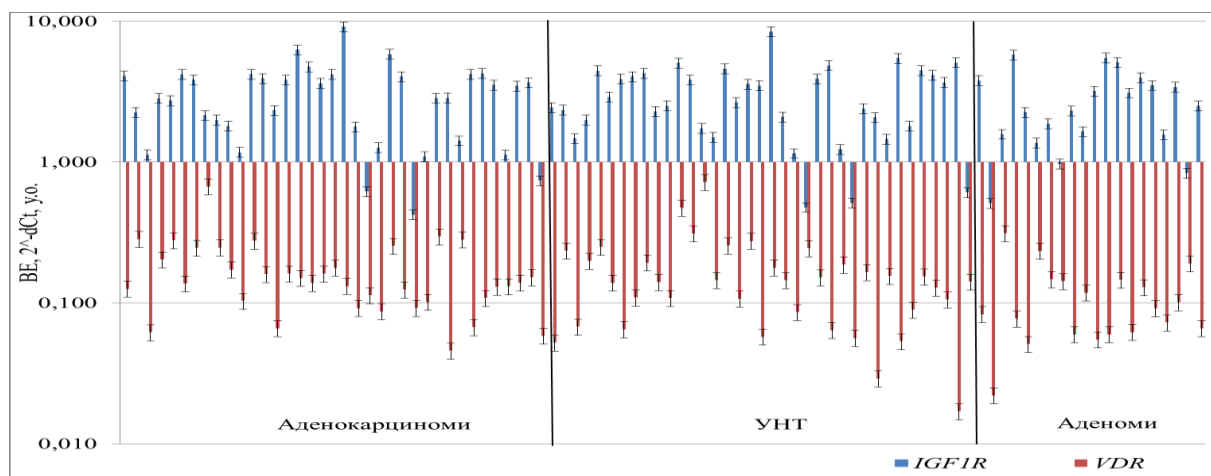


Рис. 3.38. Патерни BE генів *IGF1R* та *VDR* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Пептидний гормон пролактин (PRL) через свій рецептор (PRLR) може індукувати ріст і виживання ракових клітин передміхурової залози [728]. Експресія PRL корелює з тяжкістю перебігу захворювання. Експресія PRL є

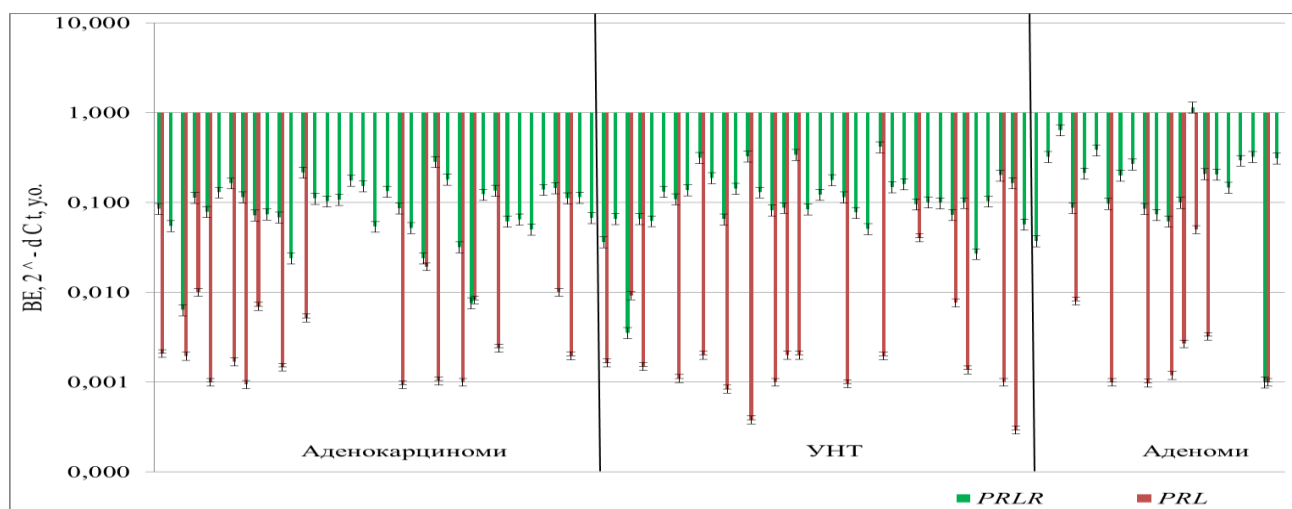


Рис. 3.39. Патерни BE генів *PRLR* та *PRL* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

дуже специфічною, та притаманна не багатьом типам клітин. Ще для одного типу рецепторів вітаміну D (кальцитріолу) показано, що зміна його функціонування впливає на утворення та прогресування раку ПЗ [729]. Крім того, експресія ГТ *TMPRSS2-ERG* збільшується при активації експресії генів *VDR* та *AR*, а, підвищення експресії ГТ *TMPRSS2-ERG* навпаки призводить до інактивації сигналіngu *VDR* [735].

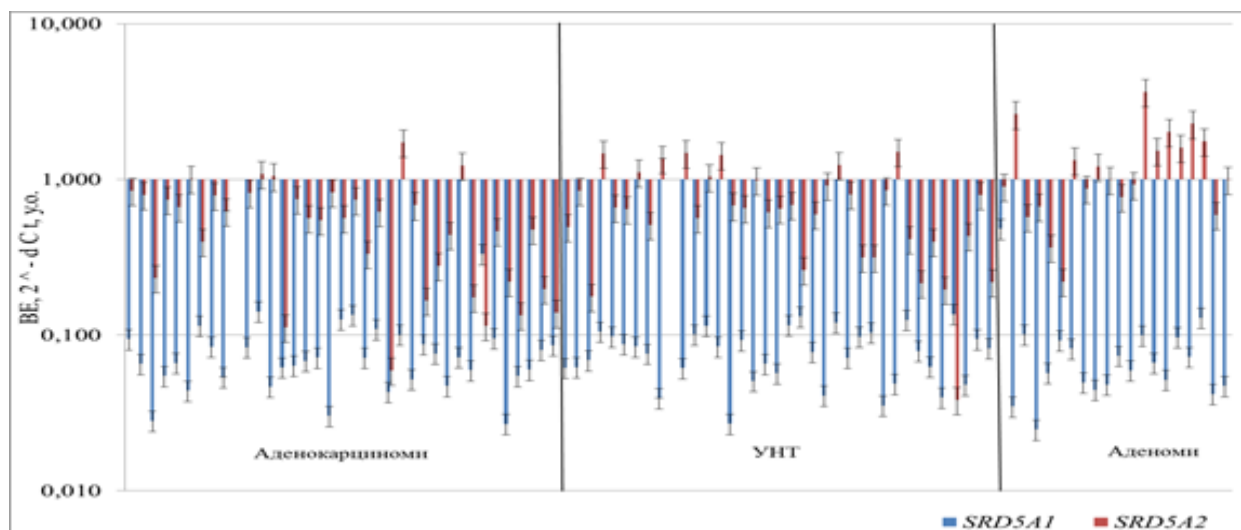


Рис. 3.40. Патерни BE генів *SRD5A1* та *SRD5A2* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

У клітинах ПЗ найбільш потужним агоністом тестостерону для *AR* є дигідротестостерон. Це метаболіт тестостерону, і реакція конверсії каталізується ензимами *SRD5A1* (5α -редуктаза, тип 1) та *SRD5A2* (5α -редуктаза, тип 2). Останні експресуються на низькому рівні у нормальних тканинах передміхурової залози, але при прогресуванні раку передміхурової залози експресія цих ферментів змінюється [736].

Встановлення рівнів BE серед 10 генів (14 транскриптів) генів, асоційованих з раком ПЗ у пухлинах, УНТ та аденомах показало, що в цій групі майже відсутні високо-експресовані гени, за винятком *IGF1R*. Більшість генів з цієї групи можна віднести до середньо-експресованих генів (*ESR1*, *GCR* (усі ізоформи), *INSRA*, *INSRB*, *PRLR*, *SRD5A2*) та низько-експресованих генів (*ESR2*, *VDR*, *PRL*, *SRD5A1*) [730, 737].

Аналіз BE генів у парних зразках аденокарцином-УНТ виявив низку значущих відмінностей між групами. Проведення парного тесту Вілкоксона з $FDR=0,1$ для залежних вибірок показало наявність значущих відмінностей між BE лише для генів *ESR1* та *INSRB* ($p=0,010$; $p=0,037$ відповідно з $FDR=0,1$). Тобто, для більшості генів цієї групи відсутні значущі відмінності BE між парними зразками П/УНТ.

Далі ми аналізували рівні BE у трьох групах зразків: аденокарциноми (П), УНТ (Н) та аденоми (А). Дані описової статистики BE для трьох груп зразків представлено у табл. 3.28. За результатами тесту Краскела-Уолліса (*) з $FDR=0,15$ значущі відмінності між групами ПНА ($p<0,05$) мають 6 транскриптів (5 генів): *ESR1*, *GCR ins AG* й *B*, *PRLR*, *VDR* та *SRD5A2*. Тоді як тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь показав наявність відмінностей BE лише для 5-и транскриптів (табл. 3.29). Відсутні зміни для *GCR ins AG* за результатами цього тесту. З цих п'яти генів/транскриптів значущі підвищення BE ($p<0,05$) у групах П та УНТ у порівнянні з аденомами мають *ESR1*, *GCR ins B*, *VDR*, тоді як гени *PRLR* та *SRD5A2* навпаки мають значні зниження BE у аденокарциномах та УНТ у порівнянні з аденомами ($p<0,05$). Жодних відмінностей між групами П та УНТ за результатами обох

Таблиця 3.28.

Дані описової статистики ВЕ генів у групах П, Н та А ПЗ

Ген/транскрипт	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні*
<i>ESR1</i>	П	0,322	0,042	2,620	0,216	0,584	<0,0001
	Н	0,173	0,038	1,380	0,095	0,439	
	А	0,064	0,015	0,367	0,049	0,110	
<i>ESR2</i>	П	0,028	0,005	0,091	0,019	0,050	
	Н	0,025	0,009	0,080	0,017	0,038	
	А	0,019	0,001	0,077	0,010	0,035	
<i>GCRAG</i>	П	2,528	0,975	14,497	2,127	3,747	
	Н	2,682	0,887	12,960	2,109	3,732	
	А	2,652	1,768	6,378	2,394	3,282	
<i>GCRAG ins</i>	П	2,606	0,950	14,659	1,697	3,979	0,0430
	Н	2,430	0,663	35,708	1,784	3,990	
	А	1,795	0,773	5,720	1,401	2,215	
<i>GCRB ins</i>	П	0,796	0,209	38,792	0,404	2,054	0,0150
	Н	0,663	0,155	38,995	0,370	1,875	
	А	0,405	0,171	1,049	0,298	0,523	
<i>INSRA</i>	П	0,313	0,056	1,498	0,184	0,459	
	Н	0,339	0,093	1,172	0,211	0,423	
	А	0,233	0,085	1,657	0,177	0,311	
<i>INSRB</i>	П	0,297	0,109	1,404	0,229	0,546	
	Н	0,258	0,097	0,830	0,159	0,429	
	А	0,286	0,035	1,997	0,239	0,383	
<i>IGF1R</i>	П	2,857	0,422	9,137	1,779	4,093	
	Н	2,654	0,476	8,430	1,801	4,145	
	А	2,408	0,510	5,759	1,571	3,649	
<i>IGF1R tr</i>	П	3,157	0,478	10,219	1,814	3,854	
	Н	2,579	0,545	13,585	1,830	3,787	
	А	2,649	0,487	7,795	1,629	3,532	
<i>PRLR</i>	П	0,103	0,006	0,284	0,062	0,133	0,0055
	Н	0,101	0,004	0,415	0,066	0,149	
	А	0,207	0,001	1,149	0,092	0,317	
<i>PRL</i>	П	0,000	0,000	0,019	0,000	0,002	
	Н	0,000	0,000	0,041	0,000	0,001	
	А	0,000	0,000	0,050	0,000	0,001	
<i>VDR</i>	П	0,138	0,046	0,669	0,103	0,203	0,0378
	Н	0,145	0,029	0,317	0,089	0,198	
	А	0,087	0,022	0,312	0,061	0,144	
<i>SRD5A1</i>	П	0,068	0,000	0,332	0,054	0,087	
	Н	0,078	0,000	0,136	0,057	0,098	
	А	0,063	0,025	0,483	0,048	0,095	
<i>SRD5A2</i>	П	0,563	0,000	1,733	0,220	0,786	0,0003
	Н	0,650	0,000	1,504	0,397	0,917	
	А	0,995	0,220	3,643	0,719	1,677	

тестів не знайдено. Слід відмітити, що ген *PRL* має достатньо низькі рівні ВЕ та експресується не більше, ніж у половині досліджуваних зразків з різними стадіями та СГ. Відомо, що у процесі канцерогенезу ПЗ експресія гена *PRL* може з'являтися безпосередньо у тканині передміхурової залози (ендогенно). Цьому гормону приписують різні функції, від впливу як гормону стресу, до промотору андроген-залежного канцерогенезу ПЗ [728], тому важливо виявляти наявність цього фактору, щоб врахувати можливі впливи при виборі засобів андрогенової деривації пухлин ПЗ [738, 739].

Таблиця 3.29.

Відмінності ВЕ досліджуваних генів у парах груп аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Ген/ транскрипт	Пари груп зі змiнами	p-рiвнi**
<i>ESR1</i>	П/А	>0,0001
	Н/А	0,0026
<i>GCR ins B</i>	П/А	0,0205
	Н/А	0,0326
<i>PRLR</i>	П/А	0,0042
	Н/А	0,0468
<i>VDR</i>	П/А	0,0483
<i>SRD5A2</i>	П/А	0,0002
	Н/А	0,0105

Примітка. ** - Статистично значущі відмінності за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

Дослідження ВЕ генів у групах пухлин та УНТ з урахуванням стадій у порівнянні з аденомами виявило низку значущих змін експресії у 8 транскриптах (7 генах) за даними тесту Краскела-Уолліса. Дані описової статистики ВЕ генів для цих груп зразків наведено у додатку М.

Серед генів зі статистично значущими відмінностями ВЕ між групами гени *ESR1*, *GCR ins AG*, *VDR* мають мінімальні значення ВЕ у групах аденом, а

гени *PRLR*, *SRD5A2* – максимальні рівні ВЕ у аденомах у порівнянні з групами П та Н з різними стадіями.

Наступний тест Дана-Бонфероні для множинних порівнянь підтвердив наявність значущих змін для 7-и транскриптів (окрім гена *IGF1R*). Дані наведені у табл. 3.30. Значуще підвищення ВЕ у групах аденокарцином та УНТ 1-2 стадії у порівнянні з аденомами спостерігається для гена *ESR1* ($p < 0,0001$; $p = 0,0107$ відповідно). Також підвищення ВЕ *GCR ins AG* виявлено у П та Н 3-4 стадії у порівнянні з аденомами ($p = 0,0402$; $p = 0,0119$), у гена *VDR* спостерігається підвищення ВЕ лише у П 1-2 стадії у порівнянні з А ($p = 0,0238$).

Зниження ВЕ у П 3-4 стадії в порівнянні з А відмічено для генів *PRLR* та *SRD5A2* ($p = 0,0058$; $p = 0,0142$), а для гена *SRD5A2* ВЕ значуще знижується ще у групі УНТ 3-4 стадії ($p = 0,004$). Цікаві зміни ВЕ спостерігаються для генів *INSRA* та *IGF1R tr*. Вони не мали змін ВЕ у загальній групі аденокарцином, але вони мали великий рівень дисперсії даних експресії. При поділі аденокарцином

Таблиця 3.30.

Значущі відмінності ВЕ досліджуваних генів у парах груп аденокарцином, УНТ з різними стадіями та аденом передміхурової залози

Ген/ транскрипт	Пари груп зі змінами	p-рівні**
<i>ESR1</i>	П 1-2 ст/А	<0,0001
	Н 1-2 ст/А	0,0107
<i>GCR ins AG</i>	П 3-4 ст/А	0,0402
	Н 3-4 ст/А	0,0119
<i>INSRA</i>	П 1-2 ст/П 3-4 ст	0,0217
<i>IGF1R tr</i>	П 1-2 ст/П 3-4 ст	0,0405
	П 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,0448
<i>PRLR</i>	П 3-4 ст/А	0,0058
<i>VDR</i>	П 1-2 ст/А	0,0238
<i>SRD5A2</i>	П 1-2 ст/А	0,0142
	П 3-4 ст/А	0,0004
	Н 3-4 ст/А	0,0040

Примітка. ** - Статистично значущі відмінності за тестом Дана-Бонфероні для множинних порівнянь

на групи згідно стадій захворювання, для генів *INSRA* та *IGF1R tr* виявлено статистично значущі відмінності ВЕ між групами П різних стадій 1-2 та 3-4 ($p=0,0217$; $p=0,0405$). Причому для обох генів ВЕ у П 1-2 стадії значно підвищена у порівнянні з П 3-4 стадії. Така ж тенденція змін ВЕ спостерігається для цих генів й у групах УНТ з різними стадіями без значущих змін між ними.

Вивчення ВЕ генів при групуванні за СГ виявило низку значущих змін. Результати статистичного аналізу наведено у додатку Н. За даними тесту Краскела-Уолліса з $FDR=0,1$ виявлено 6 генів з статистично значущими відмінностями ВЕ між досліджуваними групами: *ESR1* ($p<0,0001$), *GCR ins B* ($p=0,0012$), *INSRB* ($p=0,0459$), *PRLR* ($p=0,0224$), *VDR* ($p=0,0167$), *SRD5A2* ($p=0,0006$). І хоч наступний тест Дана-Бонферроні підтвердив наявність значущих різниць між парами груп лише для 4-х генів (табл. 3.31), все ж тенденції відмінностей ВЕ між П СГ<7 та Н СГ>7 для гена *INSRB*, де група аденокарцином має підвищений рівень ВЕ, все виявлено, як і для гена *PRLR* є тенденція різниці між ВЕ П СГ>7 та аденомами.

Таблиця 3.31.

Значущі відмінності ВЕ досліджуваних генів у парах груп аденокарцином, УНТ з різними СГ та аденом передміхурової залози

Ген/ транскрипт	Пари груп зі змiнами	p-рiвнi**
<i>ESR1</i>	П СГ<7/А	0,0003
	П СГ=7/А	0,0009
	П СГ>7/А	0,0203
	Н СГ=7/А	0,0027
<i>GCR ins B</i>	П СГ=7/А	0,0036
	Н СГ=7/А	0,0073
<i>VDR</i>	Н СГ=7/А	0,0478
<i>SRD5A2</i>	П СГ>7/А	0,0001
	Н СГ>7/А	0,0161

Примітка. ** - значущі відмінності за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

У цьому випадку у групі аденокарцином ВЕ майже у 2,5 рази нижче, ніж в аденомах. Значущі різниці ВЕ виявлено для гена *ESR1* у 4-х парах груп, причому у всіх парах відмінності ВЕ встановлені у порівнянні з аденомами. Всі три групи аденокарцином з $CG < 7$, $CG = 7$, $CG > 7$ мають значне підвищення ВЕ від 3 до 7 разів у порівнянні з ВЕ у групі А ($p=0,0003$; $p=0,0009$; $p=0,0203$ відповідно).

Крім того, зафіксовано підвищення більш ніж у 5 разів ВЕ у групі УНТ з $CG=7$ у порівнянні з аденомами. ВЕ гена *GCR* з інерцією ізоформи Б має значущі підвищення у 4-5 разів у групах П та Н з $CG=7$ у порівнянні з аденомами ($p=0,0036$; $p=0,0073$).

Ген *VDR* хоч і має підвищення ВЕ як у групах П, так і Н з $CG=7$, але значущі відмінності виявлено лише для групи УНТ ($p=0,0478$). Останній ген зі значущими змінами ВЕ при врахуванні CG є *SRD5A2*. Для нього виявлено значуще зниження ВЕ у 2-3 рази у групах П та Н з $CG > 7$ у порівнянні з А.

Отже, ми встановили рівні ВЕ 10 генів, асоційованих з раком ПЗ (14 транскриптів) та виявили гени, що мають значущі відмінності ВЕ у пухлинах, УНТ та аденомах передміхурової залози як в загальних групах, так і при групуванні за стадіями та сумою за шкалою Глісона. У табл. 3.32 наведено узагальнені дані цих змін генів. При розділенні зразків на 3 груп (ПНА) зміни ВЕ експресії знайдено для 5 генів/транскриптів, при врахуванні стадій – 7 генів/транскриптів, при групуванні за CG – 4 гена/транскрипта зі змінами.

Так, в усіх трьох типах групування зміни ВЕ спостерігаються лише у 3 генах (*ESR1*, *VDR* та *SRD5A2*). Інші гени зі змінами мають специфічні відмінності, які можуть бути пов'язані з особливостями їх експресії та, можливо, кореляціями з певними клініко-патологічними характеристиками.

Аналіз кореляцій між ВЕ генів та КПХ у аденокарциномах ПЗ здійснено за допомогою тесту рангової кореляції за Спірменом (табл. 3.33). Виявлено значущі кореляції з $p < 0,05$ до $p < 0,01$ між ВЕ простато-специфічних генів та основними клініко-патологічними характеристиками: CG , стадією, рівнем ПСА у крові та віком. Найбільша кількість кореляцій – спостерігається між ВЕ

Таблиця 3.32.

Зведені дані простато-специфічних генів, що мають значущі зміни ВЕ при різних типах групування зразків ПЗ

ПНА	ПНА+стадії	ПНА+СГ
<i>ESR1</i>	<i>ESR1</i>	<i>ESR1</i>
	<i>GCR ins AG</i>	
<i>GCR ins B</i>		<i>GCR ins B</i>
	<i>INSRA</i>	
	<i>IGF1R tr</i>	
<i>PRLR</i>	<i>PRLR</i>	
<i>VDR</i>	<i>VDR</i>	<i>VDR</i>
<i>SRD5A2</i>	<i>SRD5A2</i>	<i>SRD5A2</i>

Примітка. Жирним шрифтом – гени, які мають значущі зміни ВЕ у всіх трьох типах групувань зразків

генів та стадією захворювання. Вісім значущих кореляцій між стадією та ВЕ, серед яких п'ять є самими високими з $p < 0,01$. Причому 4 з них є негативними, тобто при рості стадії захворювання рівні ВЕ генів зменшуються: *INSRA* ($r^s = -0,478$), *IGF1R* та *IGF1R tr* ($r^s = -0,441$; $r^s = -0,486$ відповідно) та *VDR* ($r^s = -0,444$).

Таблиця 3.33.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів, асоційованих з раком ПЗ та клініко-патологічними характеристиками у аденокарциномах ПЗ

КПХ/ген	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>GCR AG</i>	<i>GCR ins AG</i>	<i>GCR ins B</i>	<i>INSRA</i>	<i>INSR B</i>	<i>IGF1R</i>	<i>IGF1R tr</i>	<i>PRLR</i>	<i>PRL</i>	<i>VDR</i>	<i>SRD5A1</i>	<i>SRD5A2</i>
СГ	-0,238	-0,354	0,157	0,178	0,073	-0,157	-0,304	-0,146	-0,086	-0,009	0,007	-0,382	0,051	-0,520
Стадія	-0,235	0,142	0,261	<i>0,377</i>	-0,087	-0,478	-0,187	-0,441	-0,486	-0,326	0,437	-0,444	-0,005	-0,395
ПСА	-0,029	-0,271	-0,001	-0,016	-0,304	-0,178	-0,315	-0,319	-0,317	-0,254	-0,168	-0,409	0,067	-0,461
Вік	0,113	-0,011	0,211	0,187	<i>0,357</i>	-0,058	-0,066	-0,004	-0,090	-0,056	-0,052	0,261	-0,156	0,032

Примітки: 1. $p < 0,05$ - курсив; 2. **$p < 0,01$** – жирний шрифт

BE гена *PRL* навпаки має позитивну значущу кореляцію зі стадією захворювання ($r^s=0,437$; $p<0,01$), хоча ніяких відмінностей BE у групах зразків для нього не виявлено. Ще 2 гена мають негативні кореляції зі стадією: *PRLR* ($r^s=-0,326$, $p<0,05$), *SRD5A2* ($r^s=-0,395$; $p<0,05$), та один ген має позитивну кореляцію зі стадією захворювання – *GCR ins AG* ($r^s=0,377$; $p<0,05$).

СГ має всього 3 значущих кореляції з BE генів, причому всі вони є негативними. Найбільшу негативну кореляцію має ген *SRD5A2* ($r^s=-0,520$; $p<0,01$). Ген *VDR* - має трохи меншу кореляцію ($r^s=-0,382$; $p<0,05$). Обидва гени мають також негативні кореляції зі стадією. Третій ген, що має негативну кореляцію з СГ – *ESR2* ($r^s=-0,354$; $p<0,05$) також не проявляв значущих змін BE у групах досліджуваних зразків.

Лише дві кореляції (негативних) має рівень ПСА – з BE гена *VDR* ($r^s=-0,409$; $p<0,05$) та гена *SRD5A2* ($r^s=-0,461$; $p<0,01$). Отже обидва ці гени мають значущі кореляції з трьома з чотирьох КПХ. Вік має лише одну позитивну кореляцію з BE гена *GCR ins B* ($r^s=0,357$; $p<0,05$), що з біологічної точки зору означає, що поява цього транскрипта збільшується з віком у хворих на рак.

Вивчення кореляцій між BE генів, асоційованих з раком ПЗ та ЕМП-пов'язаних генів показало (додаток П 1-2), що значення коефіцієнтів кореляції для деяких пар генів також набагато вищі, ніж між BE генів та КПХ. Дослідження кореляцій BE між генами в аденокарциномах передміхурової залози показало 131 значущу кореляцію (від $p<0,0001$ до $p<0,05$). Серед них 34 мають найвищі значення $r^s = |0,524-0,936|$ (від $p <0,0001$ до $p <0,05$). Максимальну кількість значущих кореляцій BE мають гени *INSRA* – 7 кореляцій, *AR 1 isof*, *GCR ins AG*, *IGF1R*, *IGF1R tr* - 6 кореляцій. Ця велика кількість кореляцій BE підтверджує міцні зв'язки між експресією генів та біологічними шляхами, які тісно перетинаються у процесі канцерогенезу.

3.4.4. Встановлення та аналіз відносної рівнів експресії генів, що приймають участь у ліпідному метаболізмі у пухлинах передміхурової залози. Порушення та зміни в шляху ліпідного обміну слугують метаболічному перепрограмуванню ракових клітин з набуттям більш агресивного фенотипу

[362, 363]. Ліпідний обмін в нормальних та ракових клітинах включає наступні основні етапи: імпорт ліпідів (ліпопротеїдів низької щільності (LDL) і ліпопротеїнів високої щільності (HDLR)); катаболізм (окислення жирних ліпідів (FAO) і цикл трикарбонових кислот; ліпогенез; синтез холестерину; експорт ліпопротеїнів і холестерину, а також зберігання ліпідів. Всі ці процеси зазвичай змінюються при розвитку пухлини і залежать від сигналів мікрооточення пухлини [364, 365].

Поглинання екзогенного холестерину та ліпопротеїдів низької щільності відбувається через рецептор ліпопротеїну низької щільності (LDLR) [363]. Відомо, що цей основний шлях опосередковує ріст пухлини. Ліпопротеїни низької щільності зазвичай зв'язуються на мембрані клітини. Цей білок інтерналізується, та транспортується до лізосом, де LDL деградує. Вивільнений холестерин може пригнічувати мікросомальний фермент 3-гідрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктазу (HMGCR). HMGCR є обмежуючим швидкість ферментом у синтезі холестерину. Холестерин відіграє важливу роль у синтезі стероїдів, в регуляції низки функцій і шляхів клітин, включаючи регулювання шляху PI3K/Akt [740].

Численні гени, які беруть участь у шляхах, пов'язаних з холестерином, і FAO, функціонування яких має вирішальне значення для росту пухлини [741]. Існує FAO -лімітуючий фермент, карнітин пальмітоилтрансфераза 1 (CPT1). CPT1 має три ізоформи, які експресуються в різних тканинах і мають власну ферментативну активність [742]. Як правило, CPT1A експресується в печінці, а CPT1C - в мозку [743]. Відомо, що обидві ізоформи, CPT1A і CPT1C надмірно експресовані у багатьох типах пухлин [742]. Регулювання CPT1C, індуковане шляхами AMPK і p53, може захистити ракові клітини від смерті в умовах позбавлення глюкози і кисню [744]. Це збільшує їхню стійкість до позбавлення глюкози та кисню [742]. Більш того, CPT1C досить рідко експресується в метастазах епітелійних пухлин, але він залучений до регуляції процесу метастазування [745]. Показано, що блокування експресії CPT1 сенсibiliзує ракові клітини до променевої терапії та ліків, викликаючи апоптоз [746].

Одним з ключових ферментів у синтезі ліпідів є Синтаза жирних кислот (FASN) [740]. Надекспресія цього ензиму прогнозує погану виживаність хворих на рак [741]. Експресія FASN виявляється в передракових ураженнях і зберігається при метастатичних пухлинах молочної та ПЗ [747]. Нещодавно показано, що FASN може функціонувати як онкоген [748].

Особливе місце в розвитку епітелійних неоплазм належить метаболізму простагландинів, які є ліпідними месенджерами з багатьма функціями, наприклад, регуляцією пухлино-стромальної взаємодії [749]. Простагландини є похідними арахідонової кислоти, які синтезуються простагландин-ендопероксидсинтазою (PTGS), відомою також як циклооксигеназа (COX). Це ключовий фермент в біосинтезі простагландинів. Існують дві ізоформи PTGS з різною регуляцією експресії: конститутивно експресується PTGS1 (COX1) і індукованим є PTGS2 (COX2) [750]. Тобто, COX2 продукує простагландини через сигнали стимуляції [751]. За сто років відомо, що інгібітори COX2 викликають протизапальну дію [751], а лише 15 років тому була продемонстрована антипроліферативна активність на пухлинні клітини інгібіторів COX2 [247, 752], а пізніше виявлена також антиракова дія на пухлини ПЗ [317, 753]. Ці дані дають можливість розглядати цей ген у якості потенційного фармакологічного біомаркери, як і інші гени, що приймають участь у ліпідному метаболізмі. Для цього необхідно спочатку встановити рівні експресії їх у пухлинах ПЗ та проаналізувати їх можливі кореляції з КПХ та експресією інших пухлино-асоційованих генів.

Ми проаналізували рівні BE 5 генів, що приймають участь у різних ланках ліпідного метаболізму (*FASN*, *CPT1C*, *LDLR*, *HMGCR*, *COX2*) (рис. 3.41.-3.43) в 37 аденокарциномах, 37 парних УНТ та 20 аденомах ПЗ [754]. Зразки аденокарцином розташовуються, відповідно до збільшення стадії пухлин та СГ, як і їх парні зразки УНТ.

Два з досліджуваних гени, а саме *FASN* і *COX2*, експресувалися на високих рівнях, тоді як інші три, а саме *LDLR*, *HMGCR*, *CPT1C*, показали

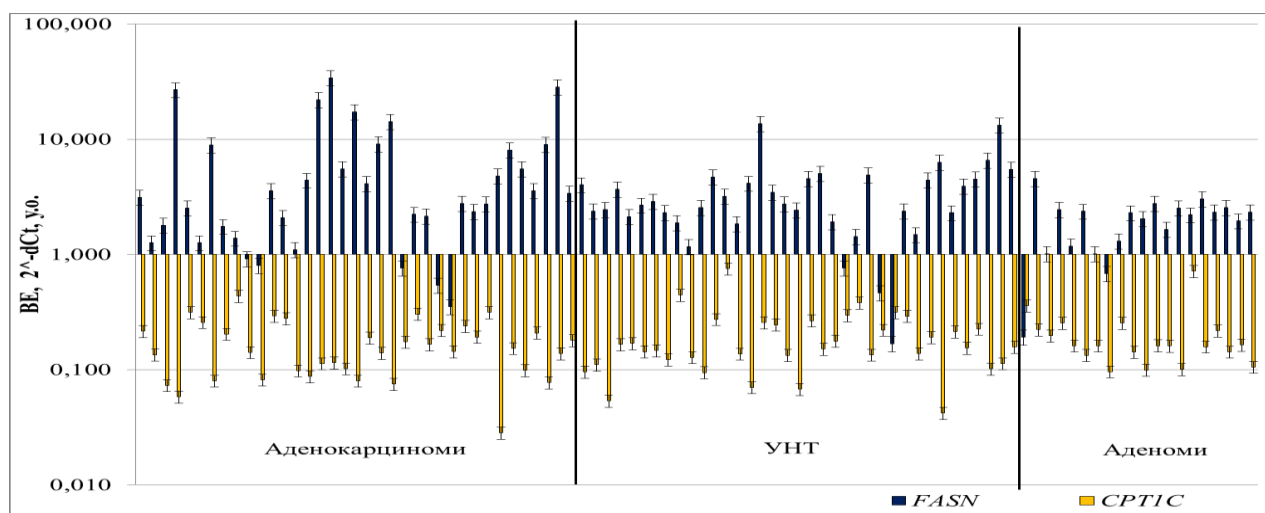


Рис. 3.41. Патерни BE генів *FASN* та *CPT1C* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

помірний і низький рівні BE. Найнижчі рівні BE були виявлені для гена *CPT1C* в усіх досліджуваних групах зразків.

Аналіз рівнів BE цих п'яти генів у 37 парних зразках П/УНТ не виявив значущих відмінностей BE між групами для жодного гена. Важливо відзначити, що порівняння між групами А, П і УНТ виявили значні зміни в рівнях BE генів, що беруть участь у контролі ліпідного обміну (табл. 3.34а, б). Тест Краскела-Уолліса показав значні відмінності BE для 2 генів: *FASN* ($p = 0,0253$) і *COX2* ($p = 0,0079$). Наступний тест Дана-Бонферроні виявив пари групи зразків зі

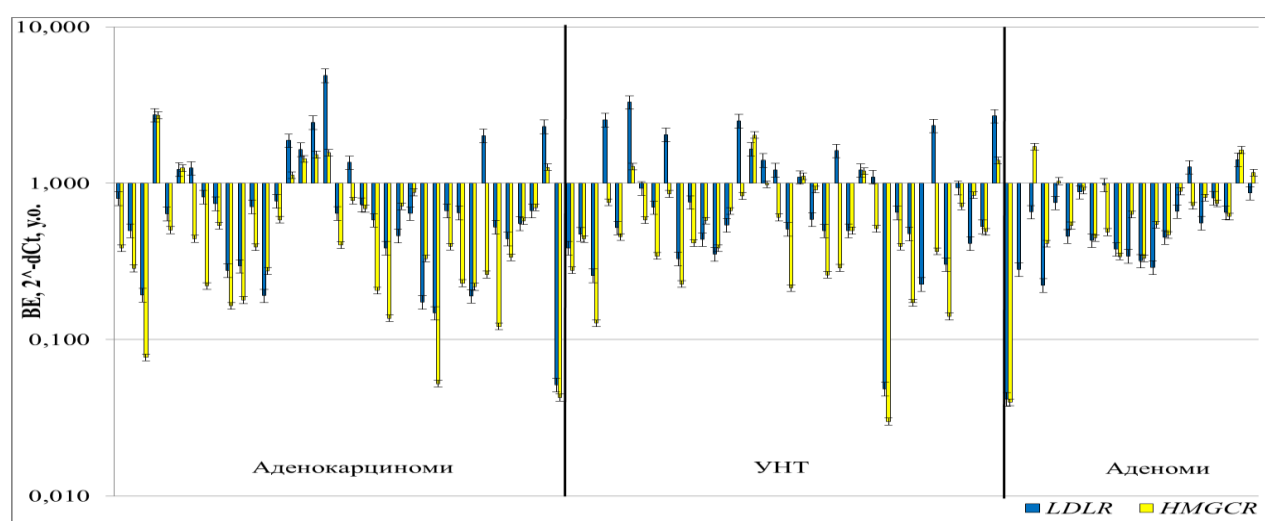


Рис. 3.42. Патерни BE генів *LDLR* та *HMGCR* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

значущими відмінностями ВЕ (табл. 3.34б) для двох генів. ВЕ гена *FASN* значно збільшилася в групі П, порівняно з групою А ($p = 0,0311$). Тоді як ВЕ гена *COX2* була підвищеною як в групах А ($p = 0,0191$), так і в Н ($p = 0,0109$) у

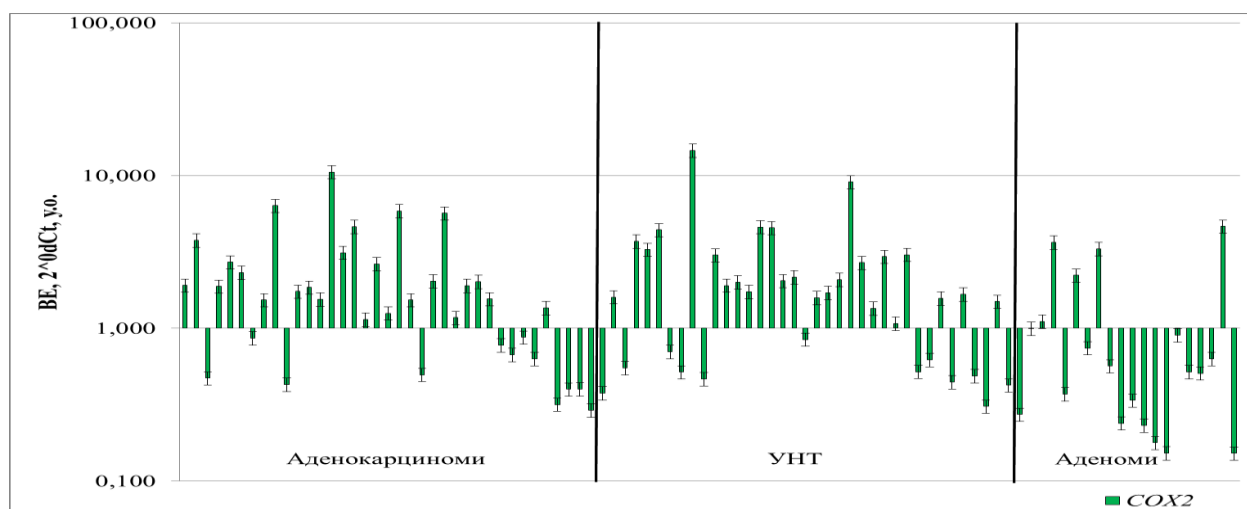


Рис. 3.43. Патерн ВЕ гена *COX2* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

порівнянні з ВЕ у групі аденокарцином (П). Інші гени не мали відмінностей ВЕ в описаних групах зразків.

Наступний розділ на групи зразків здійснено з урахуванням стадій захворювання. Дані описової статистики і p -рівні наведені у додатку Р (табл. Р1, табл. Р2). Всі зразки П були розділені на дві групи. Першу групу становлять П 1-2 стадії (28 зразків), а у другу групу були включені зразки П з 3-4 стадіями (9 зразків). Парні УНТ (Н) також були розділена на дві групи (Н 1-2 стадія та Н 3-4 стадія). Тест Краскела-Уолліса виявив значні відмінності рівнів ВЕ для 4 з 5 генів при цьому типі групування зразків. Тільки ген *CPT1C* не мав значущих відмінностей ВЕ між досліджуваними групами. Три з чотирьох генів показали різницю рівнів ВЕ в П або Н, порівняно з А, відповідно до результатів тесту Дана-Бонферроні. Рівні ВЕ генів *FASN* і *COX2* були збільшені в П 1-2 стадії, порівняно з групою А ($p = 0,0372$, $p = 0,0385$, відповідно). Крім того, ген *COX2* мав підвищений рівень ВЕ в групі Н 1-2 стадії порівняно з групою А ($p = 0,0245$). Ген *HMGCR* навпаки, мав значно знижений рівень ВЕ у П 3-4 стадії порівняно з групою А ($p = 0,0211$).

Примітно, що найвища експресія гена *HMGCR* спостерігалася в групі аденом. Ген *LDLR* має значно підвищені рівні ВЕ у групах П 1-2 стадії та Н 1-2 стадії порівняно з П 3-4 стадія ($p = 0,0156$, $p = 0,0194$, відповідно). Однак, слід зазначити, що для більшості досліджуваних генів спостерігався високий рівень

Таблиця 3.34.

Дані описової статистики генів ліпідного метаболізму за тестом Краскела-Уолліса з $FDR=0,2$ та Дана-Бонферроні для множинних порівнянь (*)

Ген	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	р-рівні
<i>FASN</i>	П	3,132	0,351	34,23	1,744	8,048	0,0253
	Н	2,75	0,068	13,687	2,132	4,511	
	А	2,252	0,191	4,567	1,241	2,485	
<i>CPT1C</i>	П	0,143	0,028	0,435	0,098	0,215	
	Н	0,154	0,042	0,754	0,122	0,245	
	А	0,161	0,096	0,714	0,133	0,217	
<i>LDLR</i>	П	0,647	0,052	4,89	0,443	1,227	
	Н	0,589	0,042	3,3	0,437	1,217	
	А	0,605	0,223	1,415	0,36	0,835	
<i>HMGCR</i>	П	0,393	0,043	9,724	0,221	0,712	
	Н	0,489	0	2,037	0,278	0,831	
	А	0,631	0,331	1,717	0,469	0,901	
<i>COX2</i>	П	1,55	0,291	10,554	0,777	2,319	0,0079
	Н	1,672	0,308	14,623	0,623	2,945	
	А	0,542	0,152	4,647	0,256	1,053	

Ген	Пари груп з відмінностями ВЕ	р-рівні*
<i>FASN</i>	П/А	0,0311
<i>COX2</i>	П/А	0,0191
	Н/А	0,0109

дисперсії ВЕ особливо у групах аденокарцином. Таке явище ми вже спостерігали для ЕМП та простато-специфічних генів [429,431].

Наступним параметром, який використовувався для групування зразків, був СГ. Серед 37 П: 11 зразків пухлин з СГ <7 (П СГ <7), 9 зразків - з СГ = 7 (П

СГ = 7) і 17 зразків - з СГ > 7 (П СГ > 7). Парні УНТ були згруповані відповідно. Описова статистика і р-значення статистичних тестів для зразків з різними СГ наведені у додатку С 1-2. Згідно з тестом Краскела-Уолліса, 3 гени показали значні відмінності в рівнях ВЕ: *FASN* ($p = 0,0163$), *HMGCR* ($p = 0,0148$) і *COX2* ($p = 0,0035$). Проте, метод Дана-Бонферроні для множинних порівнянь підтвердив наявність цих відмінностей тільки для двох генів. Ген *FASN* має значне підвищення ВЕ у П з СГ = 7, порівняно з групою А ($p = 0,0491$). Ген *COX2* показав 3-4-кратне збільшення рівнів ВЕ в групах П і Н з СГ = 7 порівняно з групою А ($p=0,0124$, $p=0,0462$, відповідно).

Рівні ВЕ гена *HMGCR* також показали тенденцію до зниження у групах П з СГ <7 і СГ > 7, порівняно з групою П з СГ=7. Ця тенденція також спостерігається для груп Н з різними СГ.

Отже, зміни ВЕ низки генів, що контролюють ліпідний обмін у пухлинах передміхурової залози мають певні особливості, в залежності від стадій та СГ пухлин ПЗ. І якщо ВЕ генів *FASN* та *COX2* підвищується в групах аденокарцином ПЗ у порівнянні з аденомами, тоді як зміни ВЕ генів *LDLR*, *HMGCR* у різних групах аденокарцином мають різноспрямований характер.

Аналіз рангової кореляції за Спірменом ВЕ генів ліпідного метаболізму та КПХ у зразках аденокарцином ПЗ (табл. 3.35), виявив три несподівані негативні кореляції.

Таблиця 3.35.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) ВЕ генів ліпідного метаболізму та клініко-патологічних характеристик (КПХ)

КПХ	<i>FASN</i>	<i>CPT1C</i>	<i>LDLR</i>	<i>HMGCR</i>	<i>COX2</i>
СГ	0,170	0,017	-0,237	-0,111	-0,340
Стадія	-0,295	0,153	-0,541	-0,420	-0,188
Вік	-0,001	0,101	0,084	0,151	0,178
ПСА, нг/мл	0,070	-0,167	-0,255	-0,243	-0,296

Примітки: 1. $p < 0,05$ – курсив; 2. $p < 0,01$ – жирний курсив

Рівні ВЕ гена *COX2* показали негативну кореляцію зі СГ ($r^s = -0,3401$, $p < 0,05$). Рівні ВЕ генів *LDLR* і *HMGCR* мають негативні кореляції зі стадією захворювання ($r^s = -0,5411$, $p < 0,01$ і $r^s = -0,4204$, $p < 0,05$ відповідно). Кореляцій з іншими КПХ (віком та рівнем ПСА у крові) для цих генів не виявлено.

Виявлення значущих кореляцій ВЕ між генами ліпідного метаболізму (табл. 3.36) показало високі значення коефіцієнтів для низки пар генів. Так,

Таблиця 3.36.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів ліпідного метаболізму та КПХ у аденокарциномах ПЗ

Гени	<i>FASN</i>	<i>CPT1C</i>	<i>LDLR</i>	<i>HMGCR</i>
<i>CPT1C</i>	-0,425			
<i>LDLR</i>	0,575	-0,280		
<i>HMGCR</i>	0,488	-0,062	0,756	
<i>COX2</i>	-0,318	0,253	0,245	0,357

Примітки: $p < 0,05$ – курсив; $p < 0,01$ – жирний курсив, $p < 0,001$ – жирний

найвищий рівень має кореляція ВЕ між генами *LDLR* та *HMGCR* ($r^s = 0,756$). Найбільшу кількість кореляцій між генами цієї групи має *FASN* – три значущих різноспрямованих (позитивних і негативних) кореляції з *CPT1C* ($r^s = -0,425$, $p < 0,05$), *LDLR* ($r^s = 0,575$, $p < 0,01$), *HMGCR* ($r^s = 0,488$, $p < 0,05$).

Аналіз значущих кореляції ВЕ генів ліпідного метаболізму з 55 досліджуваними генами/транскриптами (додаток Т) показав 112 значущих кореляцій з генами ліпідного метаболізму у аденокарциномах ПЗ. Виявлено 15 кореляцій з найвищими показниками ($r^s > 0,600$, $p < 0,001$). Досліджені раніше ЕМП-пов'язані гени *NKX3-1* та *CDH1* виявляли найсильніші позитивні кореляції ($r^s > 0,637$, $p < 0,001$) з генами ліпідного метаболізму *FASN*, *LDLR* та *HMGCR*. Ці гени (*NKX3-1* і *CDH1*) розглядаються як маркери епітелійних клітин передміхурової залози, отже, можна припустити, що експресія генів *FASN*, *LDLR* і *HMGCR* пов'язана з цим типом клітин. Це додатково підтверджується негативними кореляціями експресії генів *FASN*, *LDLR*, *HMGCR* з рівнями *ACTA2* і *CXCL12*, експресованих в пухлино-асоційованих фібробластах (ПАФ), а також з експресією маркерів *CD163* і *CCL17*, пов'язаних

з пухлино-асоційованими макрофагами (ПАМ). Гени *CPT1C* і *COX2* показали негативну кореляційну залежність з описаними генами маркерами ПАФ і ПАМ.

Велика кількість значущих кореляцій ВЕ між генами з різних функціональних груп підтверджує міцні зв'язки між профілями експресії генів та сигнальними шляхами, до яких належать ці гени, які тісно перетинаються у процесі канцерогенезу та мають взаємні впливи та регуляції.

3.4.5. Встановлення та аналіз рівнів експресії маркерів мікрооточення пухлин: пухлино-асоційованих фібробластів, пухлино-асоційованих макрофагів та імунно-асоційованих генів, як потенційних показників взаємодії пухлина-організм. Відомо, що ініціація та прогресія пухлин, включаючи рак ПЗ, залежить від генетичних та епігенетичних порушень, що ведуть до транскриптомних, протеомних розладів у клітинах при онкогенні трансформації [756, 757]. Крім того змінюється багато параметрів та показників, які ієрархічно регулюються на різних рівнях (організму, органів та систем органів, тканин та клітин) [758-760]. Усі ці процеси об'єднані одним загальним феноменом – взаємодія пухлина-організм. Одним з розладів, яке призводить до появи пухлин є хронічне запалення [761, 762]. Воно може бути різних етіологій, а саме, вірусне, бактеріальне, хімічне, радіаційне або невизначеної етіології [761, 763, 764]. Однак, не дивлячись на походження, в ньому приймають участь як епітелійні клітини органів, так і стромальні елементи (фібробласти, макрофаги, ендотелійні клітини, клітини імунної системи та інші). Усі ці клітини пізніше становлять мікрооточення пухлин [765, 766], змінюючи його від інгібую чого ріст пухлин до пухлино-стимулюючого та підтримуючого [767, 768, 769]. Так, наприклад, фібробласти трансформуються у ПАФ [767, 768, 770], макрофаги набувають іншого (альтернативного) фенотипу і стають пухлино-асоційованими макрофагами (ПАМ) [771,772]. Пухлини та навколо пухлинні регіони заповнюються інфільтруються пухлино-інфільтруючим лейкоцитами (ПЛ), які супресують імунний захист та реакції [763, 773, 774].

Необхідно відмітити, що на ріст пухлин впливають антимікробні протеїни, що секретуються клітинами ПЗ. Зокрема, білок, що кодується геном *МСМВ* [775]. Крім того, компоненти головного комплексу гістосумісності мають як імуно-стимулюючі, так й імуно-супресивні властивості. Один з імуносупресивних глікопротеїнів кодується геном *HLA-G* [776].

Останнім часом за допомогою сучасних методів імуногістохімії, секвенування нового покоління та ПЛР у реальному часі ідентифіковано маркери для різних типів клітин у мікрооточенні пухлин [766, 769, 770, 773]. Ми відібрали низку генів, що є специфічними для фібробластів та ПАФ, макрофагів та ПАМ, різних субпопуляцій Т-лімфоцитів, НК-клітин, а також маркери запалення та неспецифічної імунної відповіді.

Встановлення ВЕ цих груп генів дасть змогу проаналізувати та знайти можливі кореляції з клініко-патологічними характеристиками пухлин, що може бути використано для створення панелей маркерів. Крім того, моніторинг специфічних порушень у ВЕ досліджуваних генів може бути використаний для молекулярного профілювання пухлин ПЗ.

Серед відомих генів-маркерів, що є характерними для фібробластів та ПАФ [777, 778] ми відібрали для дослідження 8 генів, патерни ВЕ яких у аденокарциномах, УНТ та аденомах наведено на рис. 3.44-3.46. Зразки

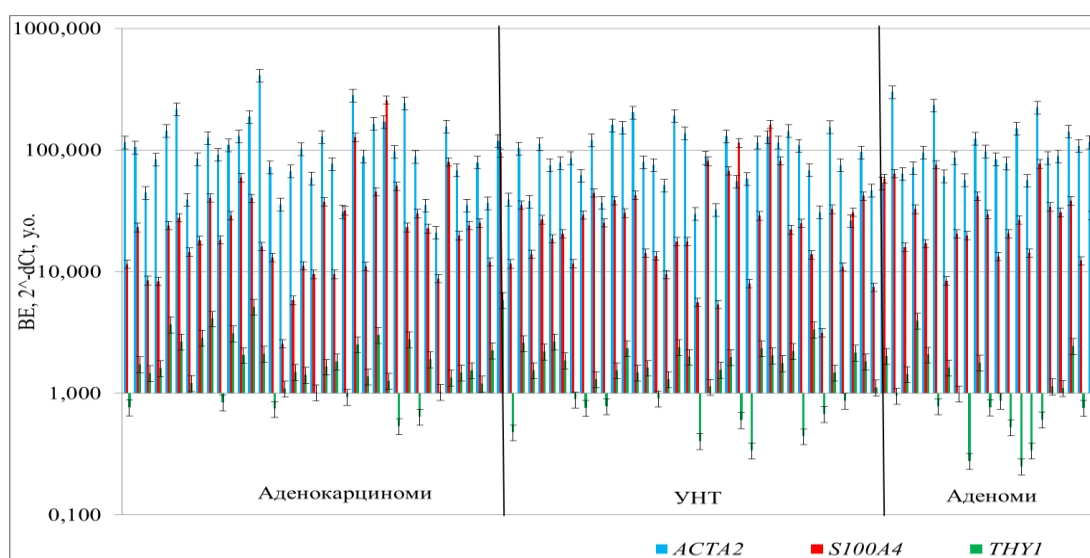


Рис. 3.44. Патерни ВЕ генів *ACTA2*, *S100A4* та *THY1* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

аденокарцином та УНТ розташовані у порядку зростання стадій та СГ у пухлинах [779, 780].

Одним з найбільш відомих маркерів ПАФ та міофібробластів є актин альфа 2 гладких м'язів, який кодується геном *ACTA2*. В цілому актини є високо

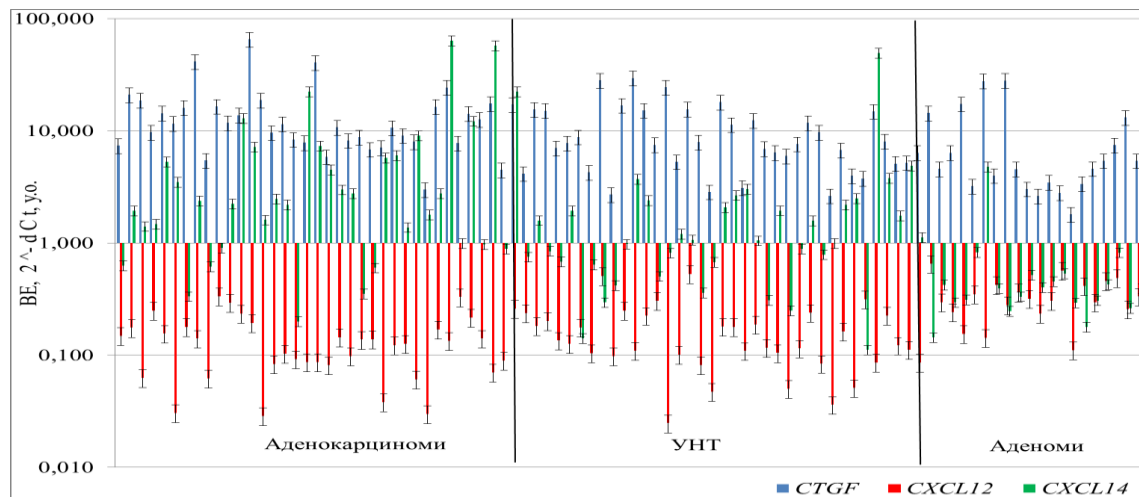


Рис. 3.45. Патерни ВЕ генів *CTGF*, *CXCL12*, *CXCL14* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

консервативними білками, які беруть участь у рухливості клітин, формуванні цитоскелету, підтриманні цілісності та міжклітинної сигналізації [781].

Підвищення експресії гена *ACTA2* виявлено для багатьох видів епітелійних пухлин, що пов'язують з появою та відвищеною активністю ПАФ

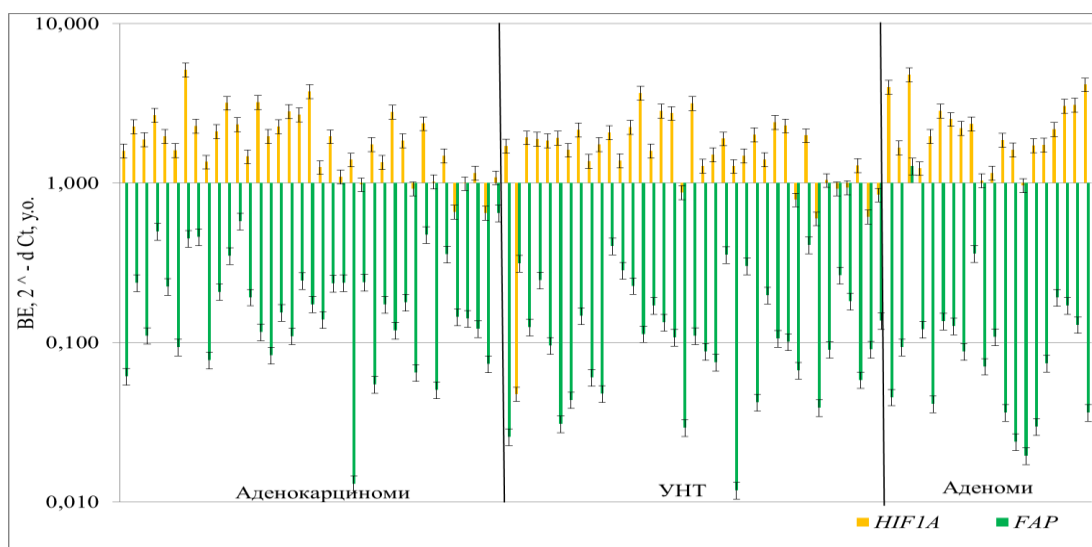


Рис. 3.46. Патерни ВЕ генів *HIF1A* та *FAP* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

[782-784], що є поганим прогнозом для лікування, а саме призводить до набуття пухлинами резистентності до хіміотерапії [785, 786].

Білок S100 кальцій зв'язуючи протеїн A4 (S100 calcium binding protein A4), що кодується геном *S100A4* приймає участь у низці процесів, в тому числі у моториці клітини, інвазії пухлин та полімеризації тубуліну [787]. Він є надекспресованим у стромальних клітинах багатьох видів пухлин [788]. Інгібування експресії гена *S100A4* є перспективним підходом для лікування раку людини [789, 790].

Thy-1 антиген клітинної поверхні (Thy-1 cell surface antigen), що кодується геном *THY1* бере участь у клітинній адгезії та клітинній комунікації в численних типах клітин, включаючи клітини імунної та нервової систем. Він грає важливу роль у регуляції проліферації ракових клітин, розповсюдженні метастазів і ангіогенезі багатьох видів пухлин [791]. Виявлено його надекспресію у ПАФ раку передміхурової залози та запропоновано ген *THY1* у якості біомаркера пухлин [792]. Крім того його надекспресія виявлена у стовбурових клітинах пухлин, що підтверджує припущення про його роль як потенційного біомаркера та мішені для терапії [793].

Білки, що кодуються генами *CTGF* (фактор росту сполучної тканини), генами хемокінів: *CXCL12* (С-Х-С мотив хемокинового ліганду 12), *CXCL14* (С-Х-С мотив хемокинового ліганду 14) входять у склад секретому ПАФ та опосередковують пухлино-стромальні взаємодії, посилюючи проліферацію та метастазування пухлин [777, 794, 795]. Показано, що активація шляху *CXCL12/CXCR4* опосередковує фенотиповий перехід від міофібробластів до ПАФ через вплив на неканонічний *EGFR/MEK/ERK* сигналінг [796].

Відомо, що приблизно 1,0-1,5% геному має транскрипційну регуляцію під впливом гіпоксії. Фактор індукований гіпоксією 1 альфа є одним з транскрипційних факторів, що модулює активність багатьох з цих генів у різних типах клітин у нормі та при розвитку багатьох видів раку [797-799]. Нещодавні дослідження дали переконливі докази високої позитивної кореляції між підвищеними рівнями *HIF1A* і метастазами пухлин, посиленням

ангіогенезу, поганим прогнозом, а також резистентністю до пухлинної терапії [800]. Відсутність експресії у порівнянні з наявністю HIF-1а була асоційована з підвищенням чутливості до хіміотерапії та кращим прогнозом для хворих на рак молочної залози [801]. Крім клітин пухлин підвищення експресії HIF1A має місце і в основних компонентах мікрооточення пухлин – фібробластах, що впливає на дерегуляцію позаклітинного матриксу, посилення васкуляризації та супресію імунної відповіді [802, 803].

Останній досліджуваний ПАФ ген *FAP*, який кодує білок активації фібробластів альфа, член сімейства серинових протеаз, селективно експресується в стромальних фібробластах раку епітелію [804], які пізніше ідентифіковано як пухлино-асоційовані фібробласти. Вважається, що цей білок бере участь у контролі росту фібробластів, епітелійно-мезенхімних взаємодій під час розвитку, відновлення тканин і епітелійного канцерогенезу, крім того має імуносупресивні властивості [805, 806] Підвищення його експресії у пухлинах є поганим прогностичним фактором [807].

Серед досліджуваної групи генів виявлено як високо-експресовані гени (*ACTA2*, *S100A4*, *CTGF*, *CXCL14*), середньо-експресовані гени (*THY1*, *HIF1A*), так і низько-експресовані гени (*CXCL12*, *FAP*). Для багатьох із них особливо у групах аденокарцином спостерігається високий рівень дисперсії ВЕ, як і для ЕМП-асоційованих та простато-асоційованих генів, описаних вище [730, 779].

Наступними важливими елементами строми пухлин, які співпрацюють з ПАФ, та впливають на процеси пухлинного розвитку, прогресії, імунної відповіді, метастазування та стійкості до лікування є пухлино-асоційовані макрофаги [497, 768, 785].

Нами відібрано 6 генів маркерів макрофагів та ПАМ для встановлення патернів ВЕ у пухлинах ПЗ. Дані рівнів ВЕ у 37 аденокарциномах, 37 парних УНТ та 20 аденомах ПЗ наведено на рис. 3.47-3.48 [779, 780].

Добре відомими маркерами протизапальних макрофагів M2, які вважаються пухлино асоційованими макрофагами, є білки, що кодуються

генами *CD68* (кодує глікопротеїн LAMP сімейства), *CD163* (кодує білок суперсімейства фагоцитарних цистеїн-багатих рецепторів) [808, 809]. Чи

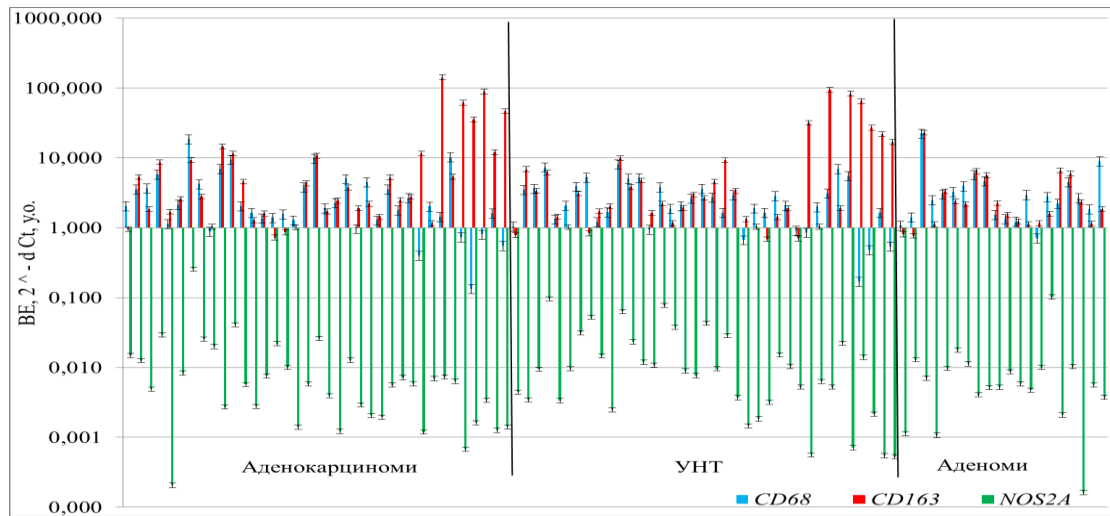


Рис. 3.47. Патерни ВЕ генів *CD68*, *CD163* та *NOS2A* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

завжди ці обидва гени експресуються в одних і тих же клітинах, поки залишається питанням [810], зважаючи на факт, що існує багато перехідних підтипів макрофагів від М1 (прозапальних) до М2 (протизапальних, пухлино асоційованих) [772, 811].

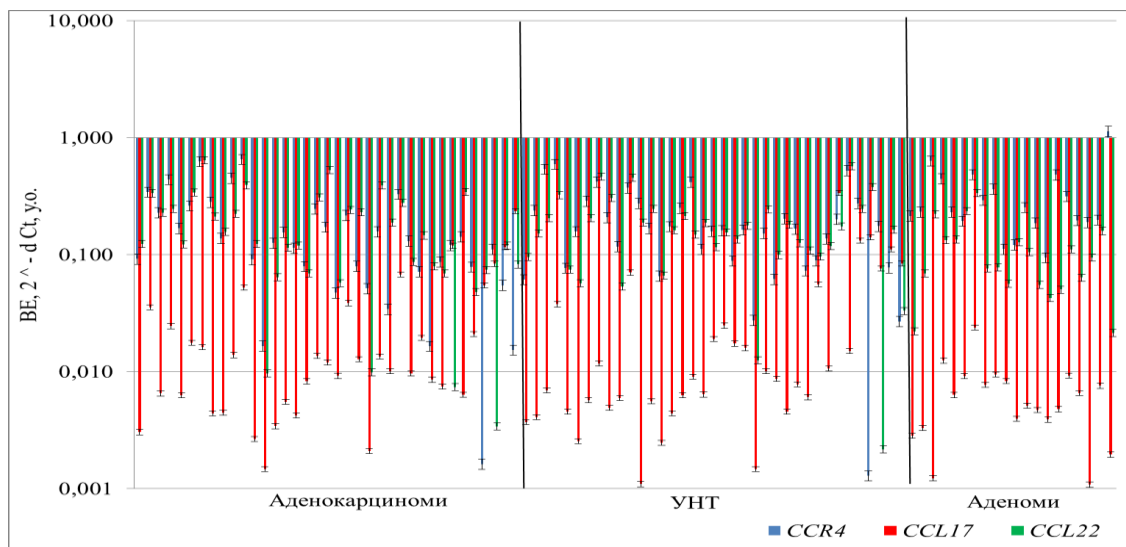


Рис. 3.48. Патерни ВЕ генів *CCR4*, *CCL17* та *CCL22* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Відомим маркером M1 або пухлино-супресуючих макрофагів є *NOS2A* (який кодує NO-синтазу 2) [812], експресія якого є позитивним прогнозом для виживання пацієнтів з раком легені [813].

Білки, що кодуються генами *CCL17* та *CCL22* секретуються ПАМ, що інгібує цитотоксичні Т-лімфоцити та дозволяє уникати пухлинам імунної відповіді [814]. У цьому ланцюгу ген *CCR4* є рецептором, на який впливає секретований *CCL22* посилюючи розвиток пухлин та метастазування [771].

Встановлення рівнів ВЕ генів маркерів субпопуляцій макрофагів у пухлинах ПЗ показало, що достатньо високі рівні має ген *CD163*, особливо у аденокарциномах на пізніх стадіях та з високим СГ, тоді як гени *NOS2A*, *CCR4*, *CCL17* та *CCL22* мають досить низькі рівні ВЕ у пухлинах ПЗ.

Наступна група генів (9 генів), які ми умовно назвали імуно-асоційовані гени (ІАГ) складається з маркерів запалення: гени *CIAS1*, *CTLA4*, маркерів різних субпопуляцій Т-клітин та натуральних кілерів: гени *IRF1*, *IL1RL1*, *IL1R1*, *IL2RA*, *KLRK1*, гена, що кодує молекулу головного комплексу гістосумісності HLA 1 класу – *HLA-G*. Останній ген у цій групі – *MSMB* кодує секреторний протеїн передміхурової залози – бета-мікросемінопротеїн, який має потенційні протимікробні властивості. Патерни ВЕ цієї групи генів у 37 аденокарциномах, 37 парних УНТ та 20 аденомах ПЗ наведено на рис. 3.49.-3.51 [779, 780].

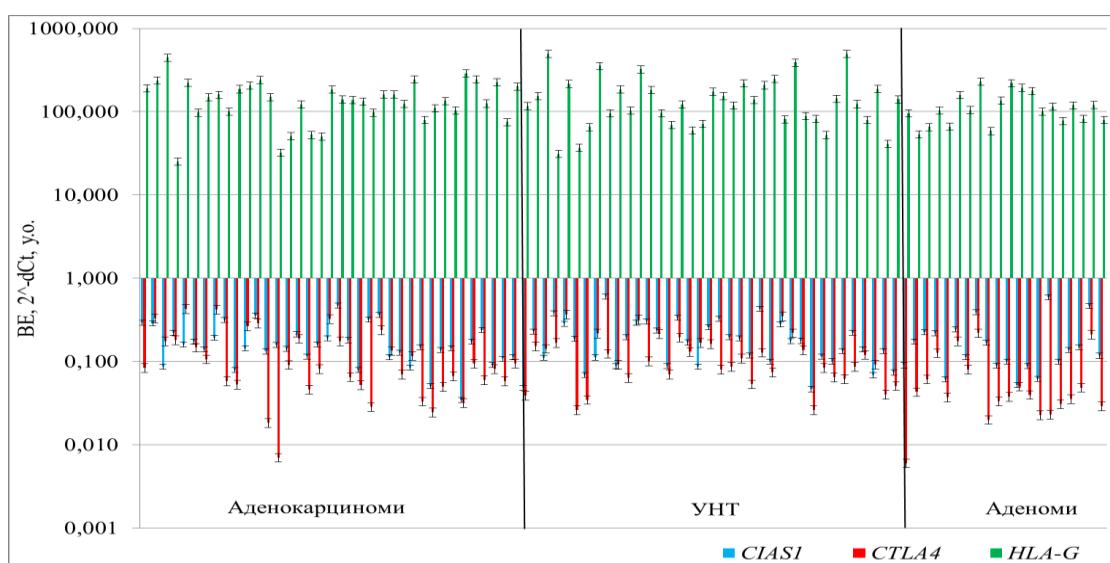


Рис. 3.49. Патерни ВЕ генів *CIAS1*, *CTLA4* та *HLA-G* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Відомо, що ген *CIAS1* (*NLRP3*) кодує білок кріопірин, що є складовою частиною інфламасом (особливі білкові комплекси, які здатні активувати каспазну активність та активність NF-кВ-шляху) макрофагів та нейтрофілів [815]. Запускаються запальні реакції при контакті з мікроорганізмами, сечовою

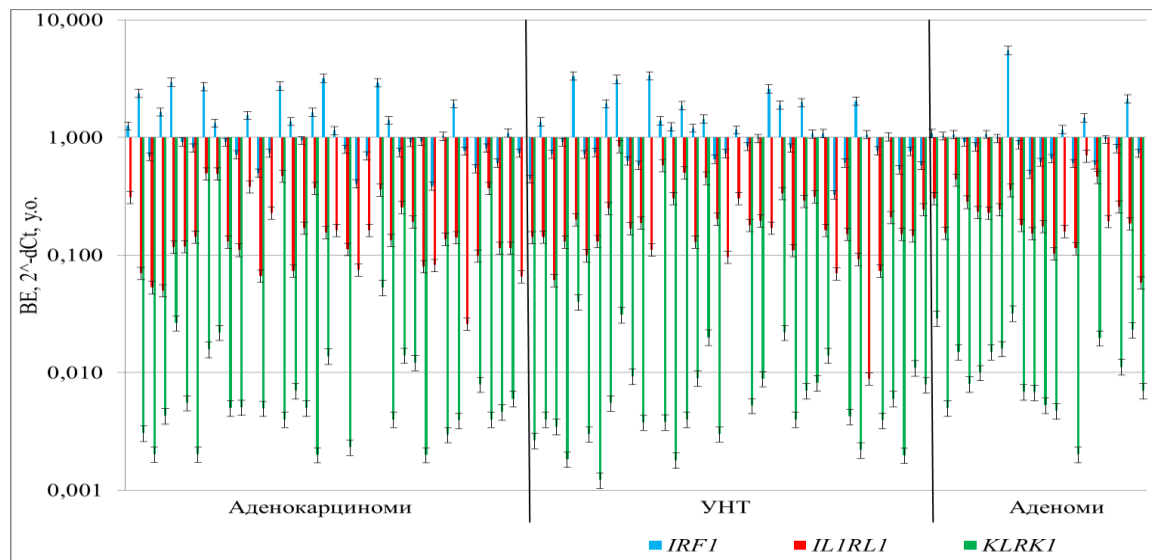


Рис. 3.50. Патерни BE генів *IRF1*, *IL1RL1* та *KLRK1* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

кислотою, низкою токсинів [816, 817]. У процесах канцерогенезу виявлено порушення функціонування кріопіринових інфламасом, що має суперечливу роль у розвитку та прогресії різних видів раку [818].

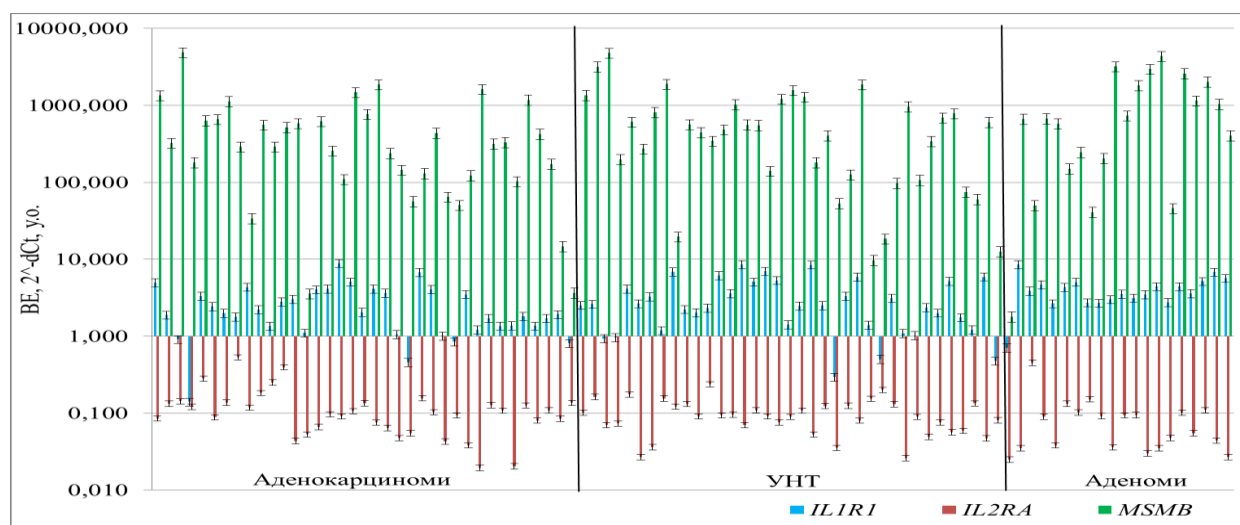


Рис. 3.51. Патерни BE генів *IL1R1*, *IL2RA* та *MSMB* у зразках аденокарцином, УНТ та аденом передміхурової залози

Ген *CTLA4* кодує імуноглобулін - білок асоційований з цитотоксичними Т-лімфоцитами 4, який передає інгібуючий сигнал до Т-клітин [819]. Він є одним з найвідоміших білків-мішеней для імунотерапії різних видів пухлин, так званий інгібітор контрольної імунної точки [820-822]. Відкритий більш ніж 15 років тому у 1996 році Джимом Елісон (Jim Allison) [823].

Ген *HLA-G* кодує білок (мембранозв'язаний та секреторний), який спочатку був відомий як білок, що захищає плід від руйнування імунною системою матері, за рахунок набування фетально-материнської толерантності.

Це відбувається завдяки зв'язуванню його з рецепторами клітин імунної системи (натуральними кілерами, Т-, В-лімфоцитами, моноцитами/дендритними клітинами) та інгібуванням їх функцій [824]. Останніми роками накопичено дані про появу експресії цього білка у низці пухлин [825, 826]. *HLA-G* визнано критичним маркером імунотолерантності до ракових клітин. Крім того показано, що його експресія тісно пов'язана з прогресуванням захворювання і поганим прогнозом для хворих [827, 828].

Визначення рівнів експресії та змін ВЕ у пухлинах маркерів різних субпопуляцій Т-лімфоцитів: Т-хелперів 1 (ген *IRF1*), Т-хелперів 2 (ген *IL1RL1*), Т-хелперів 17 (ген *IL1R1*) та Т регуляторних лімфоцитів (ген *IL2RA*) та натуральних кілерів (ген *KLRK1*) може мати діагностичну та прогностичну цінність й сприяти у стратифікації пухлин для підбору терапії [829-832], враховуючи їх різноспрямовані ролі у ефекторній та регуляторній імунній відповіді [833].

Дослідження патернів ВЕ свідчить про високі рівні експресії гена *MSMB*, що є очікуваним для цього гена, як високо-експресованого у ПЗ, і, як показують результати, цей ген має дуже високу дисперсію у досліджуваних групах пухлин, що не характерно для гена *HLA-G*, який показав достатньо високі рівні експресії в усіх групах, починаючи з аденом. З маркерів лімфоцитів більш високу експресію мають маркери Т-хелперів 1 (ген *IRF1*) та Т-хелперів 17 (ген *IL1R1*), тоді як інші мають низькі рівні ВЕ. Для цих генів також характерна досить висока дисперсія ВЕ, особливо в аденокарциномах ПЗ [779].

Ми проаналізували BE 23 генів у групах зразків: аденокарциноми, УНТ (Н) і аденоми ПЗ. Як вже описано вище з 23 генів вісім генів були маркерами фібробластів та ПАФ, ми назвали їх ПАФ групою. Шість генів пов'язані з прозапальними і імуносупресивними макрофагами (група ПАМ). Дев'ять генів пов'язані з імунними і захисними реакціями (група ІАГ).

Спочатку ми визначили відмінності в BE у П, у порівнянні з парними зразками Н. Статистично значущі відмінності BE у парних зразках П/Н представлені в табл. 3.37 (FDR = 0,2). Відмінності в BE були виявлено для 11 генів з 23 генів у парних зразках П/Н. Збільшення BE ($> 2,01$) у П у порівнянні з

Таблиця 3.37.

Значущі зміни BE між парними зразками аденокарцином та УНТ

Група	Гени	Зміни BE, к.р.	
		$>2,01$	$<0,49$
ПАФ	<i>ACTA2</i>	+	
	<i>CXCL14</i>	+	
	<i>CTGF</i>	+	
	<i>THY1</i>	+	
	<i>FAP</i>	+	
ПАМ	<i>CD163</i>	+	
	<i>CCR4</i>		+
	<i>CCL17</i>	+	
	<i>NOS2A</i>		+
ІАГ	<i>IL1R1</i>		+
	<i>MSMB</i>		+

Примітки: 1. к.р. – кількість разів; 2. “+” - наявність змін BE; 3. “-” - відсутність змін BE заданими точного тесту Фішера з FDR=0,2 ($p<0,05$)

парною Н ($p < 0,05$) спостерігалось для 7 генів: *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CD163*, *CCL17*. Зменшення BE ($< 0,49$) у П у порівнянні з парними Н ($p < 0,05$) спостерігалось для 4 генів: *CCR4*, *NOS2A*, *MSMB*, *IL1R1*. З цих 11 генів зі змінами 5 належать до групи ПАФ. Причому усі ці гени мають підвищенні рівні BE у аденокарциномах у порівнянні з їх УНТ. Чотири гени з групи ПАМ, з яких

2 гени мають підвищену ВЕ та характеризують саме фенотип ПАМ (*CD163* та *CCL17*), а ще 2 гени: *NOS2A*, *CCR4*, мають навпаки знижені рівні ВЕ й характеризують нормальні макрофаги. Два гени з відмінностями між парними П/Н відносяться до групи ІАГ та мають знижені рівні ВЕ у П. Серед них один з найпоширених секреторних білків ПЗ бета-мікросемінопротеїн, який кодується геном *MSMB* та має протимікробні/протигрибкові властивості. Крім того зниження його експресії підвищує ризик розвитку раку ПЗ [834].

Далі, зміни ВЕ аналізували в 3 групах зразків, а саме П, Н та А за моделлю 2^{-dCt} (табл. 3.38). Згідно тесту Краскела-Уолліса з $FDR=0,2$ статистично значущі відмінності ВЕ між групами зразків виявлено для 11 з 23 генів. З них 5 генів ПАФ групи (*CXCL12*, *CXCL14*, *CTGF*, *FAP*, *THY1*), 3 гени ПАМ групи (*CCR4*, *CCL17*, *CCL22*) та 3 гени ІАГ групи (*CTLA4*, *IL1R1*, *KLRK1*). Наступний тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь підтвердив значущі відмінності у парах груп для 9 з 11 генів згідно попереднього статистичного тесту (табл. 3.39). Для цих 9 генів виявлено 14 значущих відмінностей між парами груп зразків. Так, більше 9 відмінностей ВЕ знайдено між аденокарциномами та аденомами, причому для 6 генів спостерігається підвищення ВЕ у П, порівняно з А: *CXCL14* ($p<0,0001$), *CTGF* ($p=0,001$), *FAP* ($p=0,015$), *THY1* ($p=0,011$), *CCL17* ($p=0,015$), *CTLA4* ($p=0,016$). Для 3 генів виявлено значуще зниження ВЕ у аденокарциномах ПЗ у порівнянні з аденомами: *CXCL12* ($p<0,0001$), *CCR4* ($p=0,002$), *IL1R1* ($p=0,005$).

Значущі різниці між групами Н та А виявлено для 4 генів (*CXCL12*, *CXCL14*, *CCR4*, *CTLA4*), причому характер змін ВЕ співпадає з групами П. Як і в групах П, групи Н мають підвищену ВЕ генів *CXCL14* ($p<0,0001$), *CTLA4* ($p=0,003$) у порівнянні з А, та знижені рівні ВЕ генів *CXCL12* ($p=0,003$), *CCR4* ($p=0,040$). Ці дані підтверджують наші припущення щодо пухлино-асоційованих змін в УНТ. Лише ген *CXCL14* має статистично значущі відмінності ВЕ між групами П та Н ($p=0,025$), де група П має більш ніж вдвічі підвищений рівень ВЕ у порівнянні з Н. Далі ми проаналізували дані ВЕ генів при групуванні зразків з урахуванням стадій. Дані наведено у додатках У, Ф, Х.

Таблиця 3.38.

Дані описової статистики ВЕ ПАФ, ПАМ та ІАГ генів

Групи генів	Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
ПАФ	ACTA2	П	91,549	20,917	412,010	66,942	130,044	
		Н	79,746	26,263	203,147	53,219	121,144	
		А	87,832	56,143	299,884	74,621	132,950	
	CXCL12	П	0,134	0,029	0,334	0,083	0,176	<0,0001
		Н	0,122	0,025	0,527	0,098	0,202	
		А	0,301	0,110	0,651	0,249	0,417	
	CXCL14	П	2,379	0,199	63,428	0,989	6,020	<0,0001
		Н	1,048	0,111	49,347	0,672	2,085	
		А	0,394	0,143	4,779	0,293	0,485	
	CTGF	П	11,480	2,994	65,433	8,010	16,530	0,0009
		Н	7,642	2,628	29,541	5,196	14,929	
		А	4,583	1,803	28,079	3,287	10,298	
	FAP	П	0,173	0,013	0,647	0,110	0,239	0,0114
		Н	0,108	0,012	0,408	0,061	0,198	
		А	0,091	0,019	1,279	0,039	0,132	
	HIF1A	П	1,846	0,649	5,145	1,254	2,329	
		Н	1,612	0,000	3,662	1,275	2,009	
		А	2,068	0,965	4,799	1,645	2,947	
	S100A4	П	23,079	2,556	258,211	11,505	37,547	
		Н	25,018	3,141	162,320	13,505	38,508	
		А	27,764	8,390	76,886	16,446	36,073	
THY1	П	1,549	0,535	5,830	1,195	2,532	0,0140	
	Н	1,548	0,340	3,351	0,890	2,046		
	А	0,908	0,250	3,938	0,681	1,532		
ПАМ	CD68	П	2,028	0,134	18,661	1,286	3,834	
		Н	2,067	0,169	8,172	1,315	3,624	
		А	2,731	0,708	22,498	1,471	4,231	
	CD163	П	2,810	0,725	142,803	1,702	10,733	
		Н	2,685	0,689	93,815	1,422	6,904	
		А	2,019	0,771	23,007	1,156	4,488	
	CCR4	П	0,126	0,002	0,654	0,079	0,229	0,0034
		Н	0,163	0,001	0,592	0,088	0,250	
		А	0,232	0,094	3,138	0,191	0,405	
	CCL17	П	0,012	0,001	0,236	0,006	0,025	0,0161
		Н	0,009	0,001	0,336	0,005	0,025	
		А	0,006	0,001	0,024	0,004	0,009	
	CCL22	П	0,123	0,003	0,642	0,074	0,246	0,0448
		Н	0,162	0,002	0,570	0,099	0,214	
		А	0,086	0,000	0,335	0,056	0,134	
	NOS2A	П	0,006	0,000	0,257	0,002	0,013	
		Н	0,009	0,001	0,096	0,003	0,022	
		А	0,006	0,000	0,103	0,004	0,010	

Продовж. табл. 3.38.

Група генів	Гени	Група зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
ІАГ	<i>CIAS1</i>	П	0,147	0,034	0,470	0,112	0,213	
		Н	0,176	0,046	0,603	0,100	0,258	
		А	0,127	0,052	0,593	0,089	0,221	
	<i>CTLA4</i>	П	0,084	0,007	0,425	0,053	0,175	0,0027
		Н	0,101	0,026	0,365	0,064	0,162	
		А	0,039	0,006	0,219	0,030	0,071	
	<i>HLA-G</i>	П	140,847	25,081	448,585	100,768	201,285	
		Н	123,608	31,088	497,198	81,535	188,863	
		А	104,086	53,320	230,095	78,528	147,660	
	<i>IRF1</i>	П	0,925	0,386	153,203	0,738	1,545	
		Н	1,015	0,325	3,361	0,723	1,439	
		А	0,940	0,486	5,527	0,696	1,073	
	<i>IL1RL1</i>	П	0,134	0,026	0,494	0,082	0,229	
		Н	0,168	0,009	0,842	0,129	0,250	
		А	0,211	0,058	0,701	0,156	0,294	
	<i>IL1R1</i>	П	1,921	0,140	8,884	1,350	3,651	0,0067
		Н	2,519	0,294	8,550	1,397	5,087	
		А	3,733	0,708	8,572	2,880	4,871	
	<i>IL2RA</i>	П	0,103	0,019	0,533	0,066	0,135	
		Н	0,091	0,026	0,237	0,070	0,125	
		А	0,072	0,025	0,451	0,036	0,102	
	<i>KLRK1</i>	П	0,004	0,000	0,053	0,001	0,006	0,0444
		Н	0,004	0,000	0,040	0,001	0,008	
		А	0,008	0,000	0,032	0,005	0,016	
<i>MSMB</i>	П	316,495	3,563	4887,532	122,824	634,103		
	Н	485,550	9,688	4813,280	125,822	965,268		
	А	670,962	1,793	4367,280	178,170	1933,819		

Примітки: 1. * - Статистично значущі відмінності за тестом Краскела-Уолліса з FDR=0,2; 2. червоним – значущі відмінності за тестом Краскела-Уолліса, які відсутні за даними тесту Дана-Бонфероні

Аналіз даних ВЕ генів у групах зразків з урахуванням стадій захворювання виявив низку значущих відмінностей рівнів ВЕ (табл. 3.40). Серед 14 генів, для яких виявлено значущі відмінності ВЕ за тестом Дана-Бонфероні, вісім генів показали найнижчі ВЕ у групі А, а саме *CTGF*, *CXCL14*, *FAP*, *THY1*, *CD163*, *CCL17*, *CCL22* і *CTLA4*.

Таблиця 3.39.

Відмінності ВЕ досліджуваних генів у парах груп П, УНТ та А ПЗ

Групи генів	Гени	Пари груп зразків зі змінами ВЕ	p-рівні**
ПАФ	<i>CXCL12</i>	П/А	0,000
		Н/А	0,000
	<i>CXCL14</i>	П/А	0,000
		П/Н	0,025
		Н/А	0,003
	<i>CTGF</i>	П/А	0,001
	<i>FAP</i>	П/А	0,015
<i>THY1</i>	П/А	0,011	
ПАМ	<i>CCR4</i>	П/А	0,002
		Н/А	0,040
<i>CCL17</i>	П/А	0,015	
ІАГ	<i>CTLA4</i>	П/А	0,016
		Н/А	0,003
	<i>IL1R1</i>	П/А	0,005

Примітки: 1. ** - Статистично значущі відмінності за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь; 2. 0,000 – $p < 0,001$

Підвищені рівні ВЕ в групі П на стадії 1-2 ($p < 0,05$) спостерігались для генів *CTGF*, *FAP*, *THY1*, *CCL22*, *CTLA4*, тоді як підвищені рівні ВЕ в П на стадії 3-4 ($p < 0,05$) була виявлена для *CD163* і *CCL17*.

ВЕ гена *CXCL14* була підвищена в обох групах аденокарцином. Цей тип групування зразків проявив зміни ВЕ для шести генів згідно тесту Краскела-Уолліса* та лише п'яти генів за тестом Дана-Бонферроні (*HIF1A*, *CD68*, *CD163*, *CCL22*, *NOS2A*, *MSMB**), які не знайдено при тотальному групуванні пухлин ПЗ. Ймовірно це може свідчити про специфічні зміни, що притаманні пухлинам на різних стадіях захворювання, а висока дисперсія ВЕ у загальній групі аденокарцином не давала можливості виявити відмінності.

Цікаво, що чотири з цих генів крім відмінностей між групами аденокарцином і аденом мають значущу диференційну експресію між групами аденокарцином 1-2 та 3-4 стадії за тестом Дана-Бонферроні: (*HIF1A* ($p=0,008$), *CD68* ($p=0,041$), *CD163* ($p=0,016$), *CCL22* ($p=0,044$)).

Таблиця 3.40.

**Значущі відмінності ВЕ ПАФ, ПАМ, ІАГ генів у парах груп П, УНТ з
різними стадіями та А ПЗ за тестом Дана-Бонфероні**

Група генів	Гени	Пари груп зі значущими відмінностями ВЕ, $p < 0,05^{**}$	p-рівні
ПАФ	<i>CTGF</i>	П 1-2 ст/А	0,005
		П 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,028
	<i>CXCL12</i>	П 1-2 ст/А	0,000
		П 3-4 ст/А	0,034
		Н 1-2 ст/А	0,001
	<i>CXCL14</i>	Н 3-4 ст/А	0,002
		П 1-2 ст/А	0,000
		П 3-4 ст/А	0,000
	<i>HIF1A</i>	Н 3-4 ст/А	0,004
		П 1-2 ст/П 3-4 ст	0,008
		П 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,001
		П 3-4 ст/А	0,010
		Н 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,012
	<i>FAP</i>	Н 3-4 ст/А	0,001
	<i>THY1</i>	П 1-2 ст/А	0,057 [*]
ПАМ	<i>CD68</i>	П 1-2 ст/П 3-4 ст #	0,041
		П 1-2 ст/Н 3-4 ст #	0,042
	<i>CD163</i>	П 1-2 ст/П 3-4 ст	0,016
		П 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,050
		П 3-4 ст/А,	0,005
		Н 3-4 ст/А	0,017
		П 3-4 ст/Н 1-2 ст	0,003
		Н 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,010
	<i>CCL17</i>	П 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,009
		П 3-4 ст/А	0,004
		П 3-4 ст/Н 1-2 ст	0,023
		Н 1-2 ст/Н 3-4 ст	0,000
		Н 3-4 ст/А	0,000
	<i>CCL22</i>	П 1-2 ст/П 3-4 ст	0,044
		П 1-2 ст/А	0,039
<i>CCR4</i>	П 3-4 ст/А	0,000	
	П 3-4 ст/Н 1-2 ст	0,037	
<i>NOS2A</i>	П 3-4 ст/Н 1-2 ст	0,008	
ІАГ	<i>CTLA4</i>	П 1-2 ст/А	0,047
		Н 1-2 ст/А	0,022
	<i>IL1R1</i>	П 3-4 ст/А	0,007
		Н 3-4 ст/А	0,014

Примітка. # - відмінності тільки при нормалізації на *TBP*

Наступна клініко-патологічна характеристика, яку ми використали для групування зразків – СГ. Аналіз ВЕ 23 досліджуваних генів показав лише десять генів, що мають статистично значущі відмінності між групами за даними теста Краскела-Уолліса (додаток Ц, Ш, Щ) та Дана-Бонферроні (табл. 3.41).

Таблиця 3.41.

Відмінності ВЕ ПАФ, ПАМ, ІАГ генів у парах груп П, УНТ з різними СГ та аденом ПЗ за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

Група генів	Гени	Пари груп зразків зі значущими відмінностями ВЕ, $p < 0,05$	p-рівні
ПАФ	<i>CXCL12</i>	П СГ<7/А	0,0089
		П СГ=7/А	0,0034
		П СГ>7/А	0,0007
		Н СГ=7/А	0,0350
		Н СГ>7/А	0,0006
	<i>CXCL14</i>	П СГ=7/А	0,0004
		П СГ>7/А	0,0000
		Н СГ>7/А	0,0084
		П СГ>7/Н СГ<7	0,0440
	<i>CTGF</i>	П СГ=7/А	0,0270
<i>HIF1A</i>	П СГ=7/П СГ>7	0,0041	
	П СГ=7/Н СГ>7	0,0059	
ПАМ	<i>CCR4</i>	П СГ<7/А	0,0003
		Н СГ>7/А	0,0396
		П СГ<7/П СГ>7	0,0251
	<i>CCL17</i>	П СГ>7/А	0,0039
		Н СГ>7/А	0,0097
	<i>NOS2A</i>	П СГ>7/Н СГ=7	0,0017
Н СГ=7/Н СГ>7		0,0445	
ІАГ	<i>CTLA4</i>	П СГ<7/А	0,0028
		Н СГ=7/А	0,0133
	<i>IL1R1</i>	П СГ>7/А	0,0057
		П СГ>7/Н СГ=7	0,0316
	<i>IL2RA</i>	П СГ<7/А	0,0078

Примітка. 0,0000 – $p < 0,0001$

Дев'ять з них (*CTGF*, *CXCL12*, *CXCL14*, *HIF1A*, *CCR4*, *CCL17*, *CCL22*, *CTLA4* та *IL1R1*) мають також статистично значущі зміни ВЕ у групах аденокарцином з різним стадіями захворювання. Тільки ген *IL2RA* має відмінності ВЕ у групах аденокарцином з різним СГ.

Отже, аналіз ВЕ генів цих груп показав наявність значущих змін при різних типах групування з урахування КПХ для 17 з 23 генів. Майже для всіх генів в групах аденокарцином спостерігається значна дисперсія значень ВЕ, що може свідчити і про гетерогенність складових стромальних елементів і про, ймовірно, різну чутливість пухлин до певних типів терапії, враховуючи функції певних елементів строми у канцерогенезі.

Узагальнюючі дані змін ВЕ при різних групуваннях зразків з урахуванням КПХ пухлин ПЗ наведено у табл. 3.42.

Встановлення коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом (r^s) ВЕ генів ПАФ, ПАМ, ІАГ у групі аденокарциномах ПЗ від КПХ (табл. 3.43 а-в) показало, що ВЕ дев'яти генів, а саме *CXCL14*, *HIF1A*, *S100A4*, *CCL17*, *CCR4*, *NOS2A*, *CTLA4*, *IL2RA* і *MSMB* має значущі кореляції з СГ (від $p < 0,05$ до $p < 0,01$). Ген *MSMB* має негативну кореляцію зі СГ ($r^s = -0,437$), що підтверджується іншими дослідниками [835].

Рівні ВЕ дев'яти генів (*HIF1A*, *S100A4*, *CD68*, *CD163*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *NOS2A*, *IL1R1*) також мають значущі кореляції зі стадією захворювання (від $p < 0,05$ до $p < 0,001$). Шість генів з дев'яти належать до групи ТАМ. ВЕ гена *CD163* має максимальну позитивну кореляцію зі стадією ($r^s = 0,615$). Кореляції з віком має лише один ген - *THY1*. Він має хоч і невисоку, але значущу позитивну кореляцію з означеною КПХ ($r^s = 0,328$). У біологічному сенсі це означає, що його експресія збільшується зі збільшенням віку у хворих на рак. Чи є така залежність у здорових людей – невідомо. Остання проаналізована нами КПХ – рівень ПСА у крові хворих. Виявлено три гени, що мають значущі кореляції з рівнем ПСА: *CXCL14*, *IL1RL1* і *IRF1*. Причому одна з них позитивна для гена *CXCL14* ($r^s = 0,479$), дві інших – негативні.

Таблиця 3.42.

Узагальнюючі дані змін ВЕ при різних групуваннях зразків пухлин ПЗ

Група	Гени	П/УНТ парні	ПНА	ПНА зі стадіями	ПНА зі СГ
ПАФ	<i>ACTA2</i>	+			
	<i>CXCL12</i>		+	+	+
	<i>CXCL14</i>	+	+	+	+
	<i>CTGF</i>	+	+	+	+
	<i>FAP</i>	+	+	+ [#]	
	<i>HIF1A</i>			+	+
	<i>S100A4</i>				
	<i>THY1</i>	+	+	+	
ПАМ	<i>CD68</i>			+ [#]	
	<i>CD163</i>	+		+	
	<i>CCR4</i>	+	+	+	+
	<i>CCL17</i>	+	+	+	+
	<i>CCL22</i>			+	
	<i>NOS2A</i>	+		+	+
ІАГ	<i>CIAS1</i>				
	<i>CTLA4</i>		+	+	+
	<i>HLA-G</i>				
	<i>IRF1</i>				
	<i>IL1RL1</i>				
	<i>IL1R1</i>	+	+	+	+
	<i>IL2RA</i>				+
	<i>KLRK1</i>				
	<i>MSMB</i>	+			

Примітки: 1. “+” - наявність змін ВЕ за даними тесту Дана-Бонфероні для множинних порівнянь, для групи П/УНТ парні – за тестом Фішера з FDR=0,2 (p<0,05); 2. [#] наявність змін ВЕ тільки при нормалізації на *TBP*

Таблиця 3.43.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) ВЕ генів ПАФ, ПАМ, ІАГ та клініко-патологічних характеристик (КПХ)

ПАФ

КПХ	ASTA2	CTGF	CXCL12	CXCL14	HIF1A	FAP	S100A4	THY1
СГ	-0,072	-0,133	0,008	0,360	-0,403	-0,021	0,353	-0,056
Стадія	0,158	0,070	0,151	0,181	-0,538	-0,024	0,336	0,012
Вік	0,180	0,248	0,153	0,148	0,204	0,278	0,027	0,328
ПСА, нг/мл	-0,018	0,008	0,069	0,479	-0,233	0,098	0,141	0,225

ПАМ

КПХ	CD68	CD163	CCL17	CCL22	CCR4	NOS2A
СГ	-0,217	0,224	0,437	-0,304	-0,492	-0,352
Стадія	-0,369	0,615	0,435	-0,398	-0,436	-0,407
Вік	0,136	0,193	0,092	0,004	0,193	0,034
ПСА, нг/мл	-0,097	0,230	0,324	-0,174	-0,214	-0,169

ІАГ

КПХ	CIAS	CTLA4	HLA-G	IL1R1	IL1RL1	IL2RA	IRF1	KLRK	MSMB
СГ	-0,247	-0,382	-0,076	-0,272	-0,057	-0,449	-0,316	-0,154	-0,437
Стадія	-0,082	-0,148	0,246	-0,406	0,033	-0,155	-0,303	-0,111	-0,315
Вік	0,213	0,172	-0,191	-0,084	0,020	0,023	0,151	0,294	-0,180
ПСА, нг/мл	-0,119	-0,117	0,128	-0,321	-0,410	-0,166	-0,417	-0,190	-0,114

Примітки: $p < 0,05$ – червоний, $p < 0,01$ – червоний курсив, $p < 0,001$ – червоний жирний

Отже, майже дві третини досліджуваних генів мають значущі кореляції з КПХ, що підтверджує їх важливе значення у канцерогенезі пухлин ПЗ та висвітлює їх можливі функції й потенційні ролі у якості біомаркерів та потенційних мішеней для терапії.

Аналіз коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом між ВЕ 23 генів стромальних маркерів (ПАФ, ПАМ, ІАГ) у аденокарциномах ПЗ (табл. 3.44) виявив 72 значущих кореляції ($p < 0,05$), з яких 25 мали $r_s > 0,525$ та $p < 0,001$.

Найбільшу кількість найвищих кореляцій (по 5 кореляцій) з $r^s > 0,552$ та $p < 0,001$ показали гени *CD68*, *CCR4*, *CCL22*. На одну значущу кореляцію менше (4 кореляції) виявлено для *CTLA4*. Крім того гени *CD68*, *CCR4* взагалі мають найбільшу кількість виявлених кореляцій (по 11 кореляцій), на одну кореляцію менше має ген *CCL22* – 10 кореляцій та гени *HIF1A*, *CIAS1* – по 9 кореляцій між ВЕ генів. Вісім значущих кореляцій виявлено для гена *CTLA4*.

Таблиця 3.44.

**Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів маркерів
ПАФ, ПАМ та ІАГ у аденокарциномах ПЗ.**

Гени	ACTA2	THY1	CXCL12	CXCL14	CTGF	HIF1A	S100A4	FAP	CD68	CD163	CCR4	CCL17	CCL22	NOS2A
ACTA2	1,000													
THY1	0,482	1,000												
CXCL12	0,560	0,526	1,000											
CXCL14	0,270	0,233	-0,071	1,000										
CTGF	0,559	0,406	0,313	0,341	1,000									
HIF1A	0,050	0,164	0,117	-0,113	0,321	1,000								
S100A4	0,586	0,302	0,416	0,286	0,366	-0,219	1,000							
FAP	0,319	0,675	0,647	0,183	0,311	0,349	0,211	1,000						
CD68	0,044	0,437	0,314	-0,122	0,099	0,464	-0,090	0,539	1,000					
CD163	0,311	0,312	0,301	0,268	0,243	-0,287	0,634	0,228	0,090	1,000				
CCR4	0,104	0,301	0,229	-0,134	0,273	0,552	-0,005	0,359	0,708	0,076	1,000			
CCL17	0,047	0,235	0,101	0,270	0,060	-0,284	0,474	0,134	0,060	0,731	0,136	1,000		
CCL22	-0,107	0,296	0,160	-0,176	-0,096	0,362	-0,163	0,441	0,797	0,083	0,716	0,169	1,000	
NOS2A	0,078	0,057	0,040	-0,084	0,197	0,533	-0,115	0,201	0,552	-0,126	0,558	-0,144	0,435	1,000
CIAS1	0,151	0,263	0,279	-0,025	0,281	0,356	-0,155	0,207	0,580	0,052	0,496	0,015	0,452	0,419
CTLA4	-0,092	0,062	0,203	-0,206	0,061	0,418	-0,175	0,264	0,390	0,215	0,586	0,270	0,576	0,203
KLRK1	-0,143	0,079	0,172	-0,150	-0,072	0,194	-0,192	0,320	0,215	0,055	0,358	-0,015	0,319	0,109
IRF1	-0,082	0,009	-0,021	-0,224	0,008	0,505	-0,404	0,236	0,431	-0,193	0,452	-0,025	0,541	0,386
IL1RL1	0,049	-0,091	0,156	-0,273	0,050	0,243	0,005	0,008	0,187	-0,044	0,137	-0,067	0,152	0,212
IL1R17	0,064	0,054	0,059	-0,160	-0,072	0,568	-0,307	0,263	0,368	-0,454	0,347	-0,386	0,351	0,490
IL2RA	-0,222	0,172	0,185	-0,369	-0,147	0,259	-0,234	0,273	0,382	0,125	0,572	0,218	0,654	0,214
MSMB	-0,168	-0,252	-0,219	-0,283	-0,324	0,285	-0,239	-0,244	0,078	-0,189	0,267	-0,181	0,301	0,025
HLA-G	0,022	-0,063	0,255	-0,054	-0,145	-0,078	0,278	0,190	0,048	0,502	0,220	0,450	0,244	0,052

Продовж. табл. 3.44.

Гени	<i>CIAS1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>KLRK1</i>	<i>IRF1</i>	<i>IL1RL1</i>	<i>IL1R17</i>	<i>IL2RA</i>	<i>MSMB</i>
<i>CIAS1</i>	1,000							
<i>CTLA4</i>	0,414	1,000						
<i>KLRK1</i>	0,095	0,396	1,000					
<i>IRF1</i>	0,492	0,568	0,354	1,000				
<i>IL1RL1</i>	0,413	0,071	0,200	0,416	1,000			
<i>IL1R17</i>	0,355	0,126	0,202	0,502	0,344	1,000		
<i>IL2RA</i>	0,227	0,712	0,380	0,423	0,120	0,060	1,000	
<i>MSMB</i>	0,118	0,316	-0,109	0,129	0,006	0,289	0,207	1,000
<i>HLA-G</i>	-0,140	0,426	0,068	-0,131	-0,242	-0,126	0,454	0,213

Примітки: $p < 0,05$ – червоний, $p < 0,01$ – червоний курсив, $p < 0,001$ – червоний жирний

Пошук кореляцій між ВЕ 23 маркерів стромальних елементів та 17 ЕМП-пов'язаних генів виявив 102 значущих кореляції (додаток Ю). Найбільшу кількість як позитивних, так і негативних кореляцій з ВЕ генів ЕМП мають гени: *ACTA2* – 10 кореляцій, *CXCL12*, *S100A4*, *CD163* – по 9 кореляцій, *HIF1A*, *FAP*, *IL1R1* – по 8 кореляцій. Причому найбільшу кількість самих значущих кореляцій (7 кореляцій) з $r^s > 0,552$ та $p < 0,001$ має ген *IL1R1*, на 2 кореляції менше має *CXCL12* (5 кореляцій) та 4 найбільших кореляцій має ген *ACTA2* у П ПЗ. Стосовно характеру кореляцій. Так, наприклад, три маркери ПАФ гени *ACTA2*, *THY1* *CCL12* мають значущі негативні кореляції з маркерами епітелійних клітин та пухлинних клітин ПЗ генами: *KRT18*, *PSA*, *PCAZ*, тоді як навпаки з геами-маркерами мезенхімних клітин вони мають значущі позитивні кореляції: *CDH2*, *FNI*. Маркер ПАМ ген *CD163* має легко з'ясовні з біологічної точки зору негативні кореляції з генами-маркерами епітелійних клітин ПЗ: *AR*, *NKX3-1*, *CDH1*, *PSA*, *PCAZ*, та позитивні кореляції з металопротеїназами *MMP2* та *MMP9*. Інші маркери ПАМ гени *CCR4*, *CCL17*, *CCL22* також мають позитивні кореляції з геном *MMP9*.

Цікавий та зрозумілий факт, це позитивні кореляції між ВЕ генів-маркерів лімфоцитів т-хелперів: *IRF1*, *IL1RL1*, *IL1R1* та маркерів апоптозу у пухлинах: *CASP3*, *XIAP*. Але не всі виявлені кореляції можна легко пояснити з біологічної точки зору, наприклад багато значущих позитивних кореляцій *HIF1A* з маркерами епітелійних клітин генами *CDH1*, *NKX3-1*, *OCLN*. *AR 1 isof.* Хоча, виходячи з мультифункціональності білків, що кодує ген *HIF1A* можна припустити, що гіпоксичні сигнали здатні у якійсь мірі впливати на диференціювання епітелійних клітин ПЗ. Але з іншої сторони, ген *HIF1A* має також позитивні кореляції з маркерами апоптозу *CASP3*, *XIAP*, з однієї сторони, та з маркером проліферації *MKI67* з іншої. Ці факти мають свої пояснення щодо зміни експресії багатьох генів у різних сигнальних шляхах у гіпоксичних умовах розвитку та прогресування пухлин [836].

Аналіз коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом між ВЕ 23 генів стромальних маркерів (ПАФ, ПАМ, ІАГ) у аденокарциномах ПЗ та 10 генами (14 транскриптами) асоційованими з раком ПЗ виявив 94 значущих кореляції ВЕ (додаток Я).

З них 18 кореляцій з високими коефіцієнтами $r^s > 0,552$ та $p < 0,001$. З генів-маркерів стромальних елементів найбільшу кількість кореляцій з генами, асоційованими з раком ПЗ мають *IRF1* *IL1R1* – по 8 кореляцій, гени *ACTA2*, *HIF1A*, *CD163*, *CCR4* мають по 6 кореляцій. Навпаки, з генів асоційованих з раком ПЗ найбільшу кількість кореляцій з генами-маркерами строми пухлин мають *VDR* (12 кореляцій), *INSRB* (11 кореляцій), *GCR* різні ізоформи (*insAG* 10 та *AG* 8 кореляцій), *IGF1R* (9), *ESR1* та *SRD5A2* (по 8 кореляцій). Кореляції мають неоднорідний розподіл за групами маркерів стромальних елементів. Так, маркери ПАФ мають більше кореляцій з *ESR1*, глюкокортикоїдними рецепторами (*GCR*), тоді як маркери ПАМ та ІАГ мають більше кореляцій з генами *INSRA*, *IGF1R*, *VDR*, *SRD5A2*. Ген *INSRB* має багато кореляцій в усіх групах маркерів строми ПЗ. Єдиний ген з групи асоційованих з раком ПЗ, який не має кореляцій з маркерами строми взагалі – це *SRD5A1*. Він є слабо-експресованим геном, для якого не виявлено жодних змін у пухлинах ПЗ.

Отримані експериментальні дані свідчать, про значні зміни і порушення патернів ВЕ досліджуваних генів маркерів як ПАФ, ПАМ, так і генів, асоційованих з імунною відповіддю та реакціями. Встановлені високі значення коефіцієнтів кореляції як з КПХ, так і з генами інших функціональних груп характеризують тісні взаємозв'язки та взаємовпливи досліджуваних груп генів у процесі канцерогенезу ПЗ.

Отже, підтверджено можливість використання трьох комбінацій/типів референсних генів (*TBP*, *TBP* й *HPRT*, та чотирьох разом: *TBP*, *HPRT*, *ALAS1*, *TUBA1B*) після аналізу нормалізації розрахунків відносної експресії у пухлинах передміхурової залози. Важливими параметрами для вибору порогу відмінностей рівнів експресії між групами з метою правильної інтерпретації даних є рівні експресії досліджуваних генів, величина зміни значень експресії, розмір вибірки та наявність високого рівня дисперсії експресії.

Виявлено гібридний транскрипт *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1) у аденокарциномах з різними стадіями та СГ з частотою 56,8 %, в парних умовно-нормальних тканинах з частотою 43,2% та аденомах (20%) на зразках пухлин передміхурової залози у групі пацієнтів з української популяції. Аналіз частот наявності транскрипта у пухлинах дає підставу стверджувати про його появу на ранніх стадіях канцерогенезу передміхурової залози.

Встановлено та проаналізовано рівні відносної експресії у аденокарциномах з різними клініко-патологічними характеристиками, умовно-нормальних тканинах та аденомах 19 генів, пов'язаних з епітелійно-мезенхімним переходом, серед яких виявлено диференційно-експресовані (*AR*, *CDH1*, *KRT18*, *MMP9*, *OCLN*, *PCA3*, *HOTAIR*, *SCHLAP1*) та 10 генів асоційованих з раком передміхурової залози, серед яких зміни експресії виявлено для *ESR1*, *GCR*, *PRLR*, *VDR*, *SRD5A2*.

Встановлено, що з п'яти генів ліпідного метаболізму, які охоплюють різні ланки цього процесу, чотири гени: *FASN*, *LDLR*, *HMGCR* та *COX2* мають значні зміни відносної експресії у аденокарциномах з різними стадіями та СГ у порівнянні з аденомами та умовно-нормальними тканинами. Це свідчить про

значні порушення обміну ліпідів при прогресії раку передміхурової залози, що стосуються як клітин пухлин, так і стромальних елементів, та можливу роль цих генів як фармакологічних маркерів поряд з генами *PTEN* та *AR*.

Виявлено диференційну експресію 11 з 23 генів, пов'язаних зі стромальними елементами пухлин та імуно-асоційованих генів у аденокарциномах в порівнянні з аденомами передміхурової залози, з них 7 генів мають підвищену експресію у злоякісних пухлинах: *ACTA2*, *CXCL14*, *CTGF*, *THY1*, *FAP*, *CD163*, *CCL17*, а чотири – знижену: *CCR4*, *NOS2A*, *MSMB*, *IL1R1*. Найбільшу кількість змін встановлено у групах аденокарцином з різною стадією захворювання для генів *CXCL12*, *CXCL14*, *CTGF*, *FAP*, *HIF1A*, *THY1*, *CCL17*, *CCL22*, *CCR4*, *CD68*, *CD163*, *NOS2A*, *CTLA4*, *IL1R1*, що свідчить про важливу роль стромальних елементів у канцерогенезі передміхурової залози.

Роботи, опубліковані за матеріалами підрозділу: [676, 695, 720, 730, 737, 754, 779, 780].

3.5. Встановлення зв'язків між експресією пухлино-асоційованих генів на рівнях мРНК й білку та типів клітин, що їх експресують

Ми вже продемонстрували, що відносна експресія семи пухлино-асоційованих генів, а саме *TGFB1*, *IL1B*, *FOS*, *EFNA5*, *TAGLN*, *PLAU* та *EPDR1*, змінюється у клітинних лініях раку передміхурової залози [619, 639, 640, 656], а також в тканинах раку ПЗ [671, 672]. Білки, що кодуються цими генами, відіграють важливу роль у канцерогенезі і беруть участь у низці клітинних процесів і шляхів. Наприклад, *TGFB1* бере участь у контролі на ЕМП і ангіогенезі [837]. Важливо, що існує взаємодія між сигнальними шляхами *TGFB1* і андрогенних рецепторів, що має вирішальне значення для розвитку та прогресування раку ПЗ [838]. Зазвичай білок *TGFB1* експресується в реактивних клітинах стромальних пухлин, тобто пухлино-асоційованих фібробластах (ПАФ) [839]. Іншим важливим гравцем є білок *IL1B*, прозапальний цитокін, який експресується в імунних клітинах і активує шлях

NF- κ B [840]. Високі рівні білка IL1B сприяють прогресуванню метастатичного раку передміхурової залози [841]. Білок, що кодується геном *FOS* є фактором транскрипції, який бере участь у багатьох клітинних процесах, і серед них проліферація клітин і апоптоз [842, 843]. Білок FOS бере участь у розвитку андроген-резистентного раку передміхурової залози, у метастазуванні [844], а також у розвитку інших типів пухлин [667, 845, 846].

Гени *EFNA5*, *TAGLN* та *EPDR1* кодують білки адгезивного апарату, таким чином, контролюючи прогресування пухлини [660]. Білок PLAУ може регулювати міграцію і інвазію при розвитку пухлин ендометрія і ПЗ [847, 848].

Окрім зміни експресії описаних семи генів, ми виявили, що специфічні для раку ПЗ гени [730] і пухлинні стромальні елементи [779] демонструють диференційну експресію в зразках тканин раку передміхурової залози порівняно з доброякісними пухлинами. Крім того, виявлено зміни експресії генів, залучених до ЕМП [720].

В даному дослідженні ми вважаємо важливим порівняти експресію семи генів (*EFNA5*, *EPDR1*, *FOS*, *IL1B*, *PLAU*, *TAGLN* і *TGFBI*) на рівнях мРНК і білка, встановити типи клітин, що їх експресують і проаналізувати можливі кореляції між експресією цих генів і специфічних для раку ПЗ генів, маркерів стромальних елементів, генів, що асоційовані з ЕМП [849]. Даний аналіз проведено на 29 зразках аденокарцином, 29 парних УНТ та 14 аденомах ПЗ, КПХ яких описані раніше.

Зміни рівнів ВЕ досліджуваних генів були проаналізовані для трьох груп зразків у (П, Н, А). За результатами тесту Краскела-Уолліса з FDR=0,2 виявлено значущі відмінності ВЕ для трьох генів (табл. 3.45).

Значущі відмінності ВЕ між парами груп підтверджено для цих трьох генів *FOS*, *PLAU*, *EPDR1* за результатами й іншого тесту Данна-Бонферроні для множинних порівнянь ($p < 0,05$) (табл. 3.46). Для всіх трьох генів знайдено відмінності ВЕ як для П, так і Н у порівнянні з А. ВЕ *FOS* у групах П і Н підвищена у порівнянні з групою А ($p=0,0017$, $p=0,0035$ відповідно).

Подібний характер змін ВЕ для цих трьох генів ми спостерігали в групах з урахуванням стадій пухлин (рис. 3.52). Для гена *FOS* детектовано значуще підвищення ВЕ у групах А 1-2 стадія та Н 1-2 стадія у порівнянні з А ($p=0,0065$, $p=0,0309$ відповідно). Для гена *PLAU* винайдено значуще зниження ВЕ у групах П 1-2 стадія та П 3-4 стадія ($p=0,0091$, $p=0,0069$ відповідно), тоді як

Таблиця 3.45.

Дані описової статистики ВЕ генів у групах аденокарцином (П), УНТ (Н) й аденомах (А) ПЗ та відмінності ВЕ згідно тесту Краскела-Уолліса (*)

Гени	Група	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні *
<i>TGFB1</i>	П	0,750	0,254	1,813	
	Н	0,707	0,517	1,458	
	А	0,534	0,375	0,846	
<i>IL1B</i>	П	0,957	0,369	3,311	
	Н	1,352	0,707	3,422	
	А	0,565	0,224	2,383	
<i>FOS</i>	П	32,287	14,955	80,560	0,0012
	Н	31,950	17,623	57,463	
	А	3,380	0,628	17,489	
<i>EFNA5</i>	П	1,741	0,463	6,759	
	Н	3,148	1,180	11,277	
	А	1,373	0,788	1,773	
<i>TAGLN</i>	П	0,508	0,071	2,154	
	Н	0,826	0,162	1,738	
	А	0,450	0,378	0,599	
<i>PLAU</i>	П	0,026	0,003	1,000	0,0007
	Н	0,112	0,013	1,000	
	А	1,440	0,807	2,041	
<i>EPDR1</i>	П	0,088	0,016	0,688	0,0052
	Н	0,082	0,028	0,677	
	А	0,945	0,507	1,149	

Таблиця 3.46.

Значущі відмінності ВЕ у парах груп П, УНТ та А передміхурової залози за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь ()**

Гени	Пари груп з відмінностями ВЕ	p-рівні **
<i>FOS</i>	П/А	0,0017
	Н/А	0,0035
<i>PLAU</i>	П/А	0,0005
	Н/А	0,0121
<i>EPDR1</i>	П/А	0,0057
	Н/А	0,0157

для груп УНТ ВЕ відмінностей не виявлено. ВЕ гена *EPDR1* має значуще зниження у групі П 1-2 стадія у порівнянні з А ($p=0,0467$). Тоді як ВЕ генів *PLAU* та *EPDR1* у П і Н групах знижена у порівнянні з А ($p=0,0005$, $p=0,0121$ для гена *PLAU*, $p=0,0057$, $p=0,0157$ для *EPDR1* відповідно).

Пошук змін ВЕ досліджуваних генів (рис. 3.53) серед груп зразків з урахуванням СГ виявив п'ять генів зі значущими відмінностями ВЕ за даними тесту Дана-Бонферроні між парами груп.

ВЕ гена *FOS* має значуще підвищення у П СГ=7 в порівнянні з А ($p=0,005$). Також значне підвищення ВЕ у порівнянні з А має Н СГ=7 гена *EFNA5* ($p=0,0274$). Два гени *PLAU* та *EPDR1* навпаки мають значущі зниження ВЕ у групах П й Н зі СГ>7 у порівнянні з А ($p=0,0011$, $p=0,0479$ для гена *PLAU*; $p=0,0469$, $p=0,0420$ для гена *EPDR1* відповідно). Лише ВЕ *TAGLN* має відмінності тільки між групами Н з СГ<7 та СГ=7 ($p=0,0458$).

Аналіз можливих взаємозв'язків ВЕ досліджуваних генів з КПХ і експресією простато-специфічних генів, стромальних маркерів та генів пов'язаних з ЕМП виявив значущі кореляції за тестом Спірмена (табл. 3.47а, б).

Аналіз коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом (r^s) не виявив значущих кореляцій між ВЕ досліджуваних генів і КПХ, як ми показали раніше [671, 672]. Тоді як встановлено низку значущих кореляцій між ВЕ

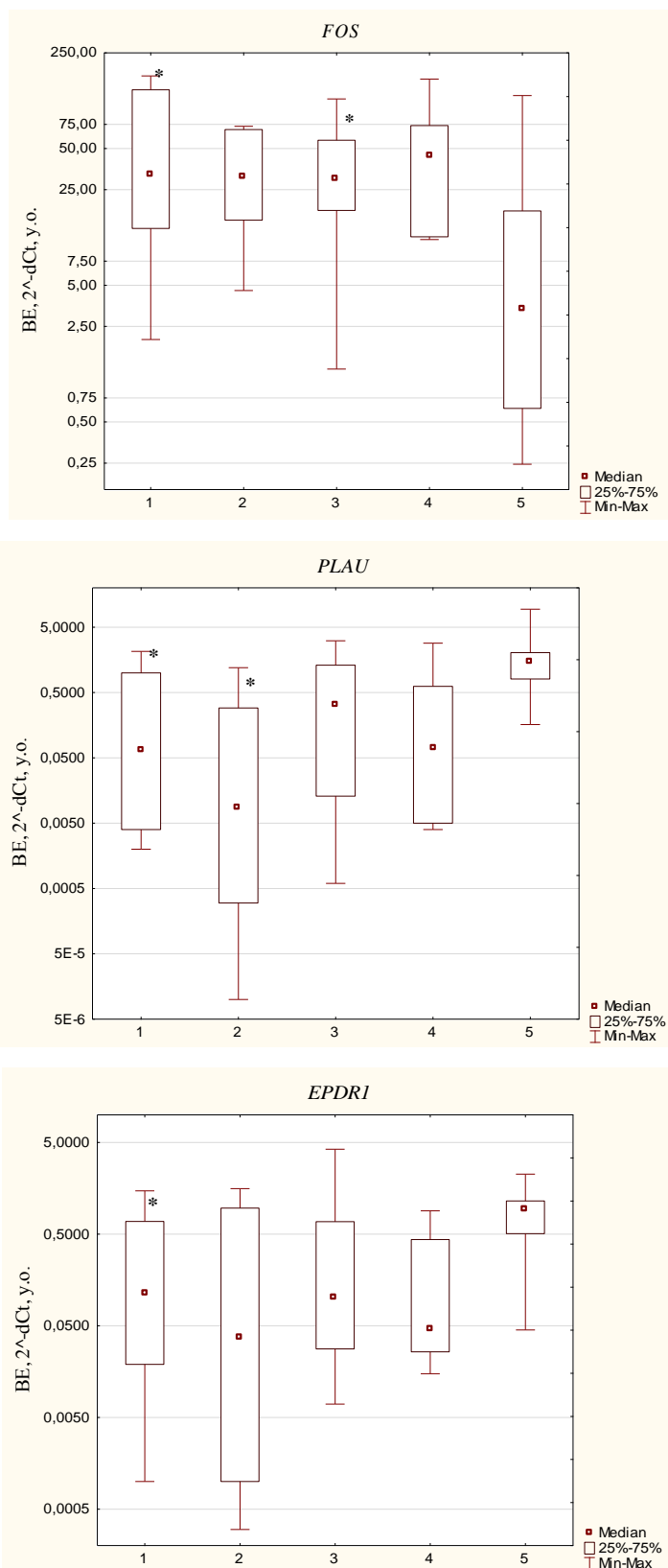


Рис. 3.52. Коробкові діаграми показників BE генів *FOS*, *PLAU*, *EPDR1* у групах зразків з різними стадіями захворювання: 1 – П 1-2 стадія, 2 – П 3-4 стадія, 3 – Н 1-2 стадія, 4 – Н 3-4 стадія, 5 – Аденоми; * - значущі відмінності BE у порівнянні з групою аденом згідно тесту Дана-Бонферроні ($p < 0,05$)

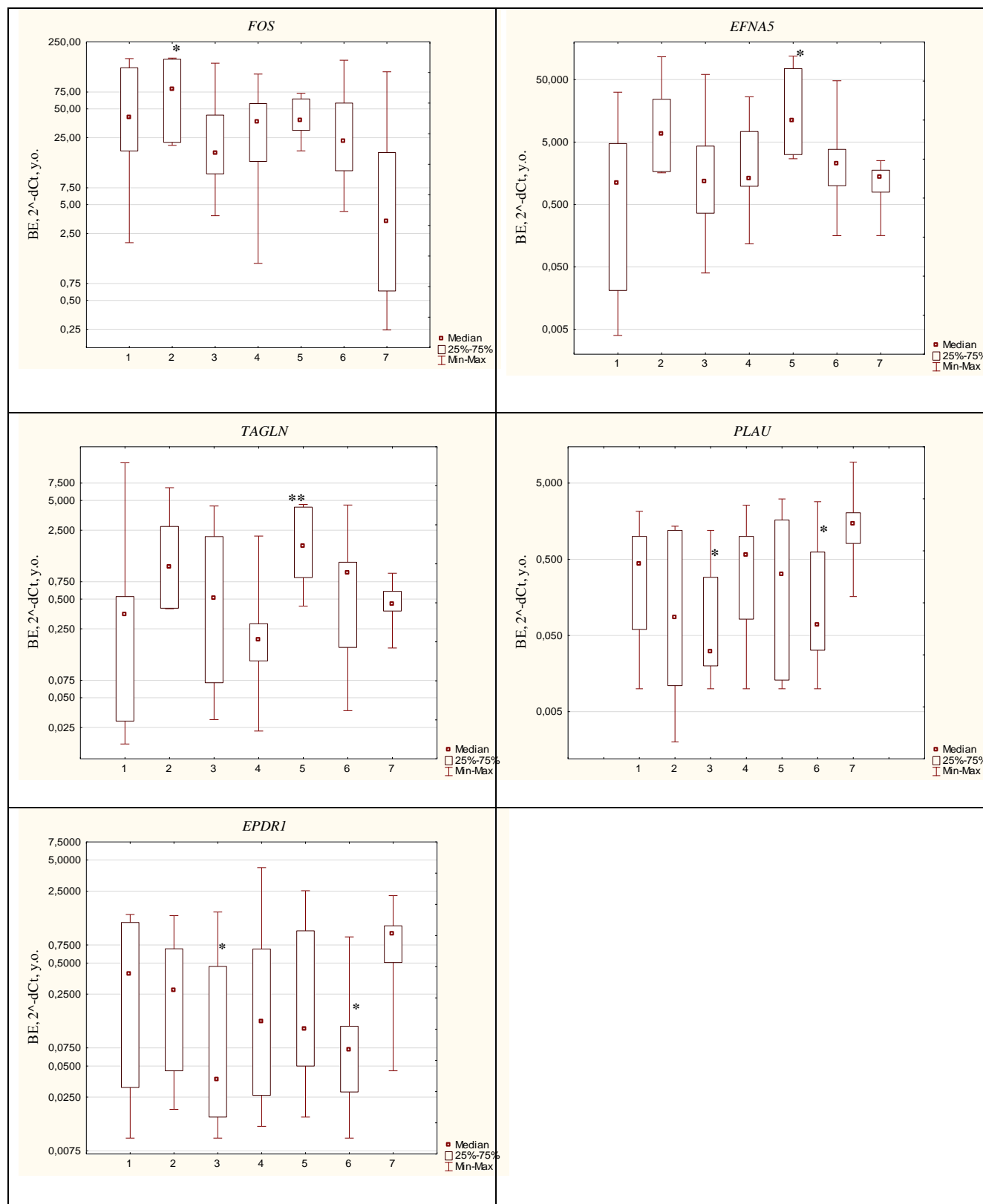


Рис. 3.53. Коробкові діаграми показників BE генів *FOS*, *EFNA5*, *TAGLN*, *PLAU* та *EPDR1* зі змінами BE у групах зразків з різними СГ: 1 – П СГ<7, 2 – П СГ=7, 3 – П СГ>7, 4 – Н СГ<7, 5 – Н СГ=7, 6 – Н СГ>7, 7 - А. * - значущі відмінності BE у порівнянні з групою аденом ($p<0,05$), ** - значущі відмінності BE між Н СГ<7 та Н СГ=7, згідно тесту Дана-Бонферроні ($p<0,05$).

Таблиця 3.47.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ семи досліджуваних генів (а) та простато-специфічних, стромальних маркерів (б)

а

Гени	<i>TGFB1</i>	<i>IL1B</i>	<i>FOS</i>	<i>EFNA5</i>	<i>TAGLN</i>	<i>PLAU</i>
<i>IL1B</i>	0.5828					
<i>FOS</i>	0.3404	0.6310				
<i>EFNA5</i>	0.8873	0.6636	0.3976			
<i>TAGLN</i>	0.6836	0.3730	0.3547	0.6276		
<i>PLAU</i>	0.3710	0.2797	0.0523	0.3449	0.1875	
<i>EPDR1</i>	0.5309	0.3258	0.0471	0.5065	0.4328	0.5598

б

Гени	<i>TGFB1</i>	<i>IL1B</i>	<i>FOS</i>	<i>EFNA5</i>	<i>TAGLN</i>	<i>PLAU</i>	<i>EPDR1</i>
<i>CDH2</i>	0,3128	-0,0177	-0,0951	0,3370	0,4998	-0,0133	0,2667
<i>FNI</i>	0,4103	0,3064	0,3374	0,4461	0,7703	0,0636	0,1802
<i>MMP2</i>	0,3956	0,0897	0,0665	0,3614	0,2801	0,3059	0,2001
<i>KRT18</i>	-0,4266	-0,2379	-0,3143	-0,3633	-0,6806	-0,1416	-0,0917
<i>CASP3</i>	0,2335	0,2207	0,035	0,3003	0,5067	0,1623	0,3983
<i>PTEN</i>	0,2931	0,1246	0,2374	0,401	0,4028	0,2161	0,0547
<i>PSA</i>	-0,3108	-0,1655	-0,3419	-0,2101	-0,5185	-0,1761	-0,0969
<i>HOTAIR #</i>	0,0718	-0,0969	-0,003	0,0887	0,4854	-0,1694	0,1826
<i>SCHLAPI #</i>	-0,312	-0,3815	-0,4544	-0,2763	-0,4481	-0,3223	-0,091
<i>GCR (AG isof)</i>	0,2345	0,0966	0,0374	0,2131	0,5646	0,1564	0,2016
<i>SRD5A2</i>	0,3235	0,4527	0,1905	0,4264	0,0079	0,3383	0,149
<i>ACTA2</i>	0,3690	0,1453	0,2645	0,319	0,6126	0,2408	0,2097
<i>CXCL12</i>	0,2764	0,23	0,3212	0,3468	0,3380	0,371	0,1949
<i>CTGF</i>	0,1803	0,4345	0,4064	0,2037	0,4303	0,3651	0,2378
<i>HIF1A</i>	0,3921	0,5286	0,3296	0,503	0,2663	0,2891	0,2704
<i>FAP</i>	0,3197	0,302	0,1882	0,4658	0,2151	0,2748	0,1464
<i>CIAS</i>	0,0315	0,3089	0,4655	0,0631	0,1909	0,2728	0,0791
<i>IRF1 (T1)</i>	0,0512	0,3828	0,3724	0,1682	0,1567	0,0059	0,0527
<i>ILIRL1 (T2)</i>	0,0586	-0,0246	0,0749	-0,032	0,3971	-0,0577	0,1836
<i>ILIR1 (T17)</i>	0,2916	0,2172	0,0502	0,4183	0,2483	-0,0562	0,1336
<i>CCR4</i>	-0,0335	0,1616	0,0227	0,0475	-0,1054	0,3725	0,0012
<i>CCL22</i>	-0,2163	-0,034	-0,0833	-0,0564	-0,4185	0,1367	-0,0882
<i>NOS2A</i>	0,3901	0,2493	0,1867	0,3084	0,219	0,1253	0,0781

Примітки: 1. $p < 0.05$ - червоний; 2. $p < 0.05$ – червоний жирний; 3. $p < 0.001$ - червоний жирний курсив; 4 # - lncRNA

досліджуваних генів в аденокарциномах (табл. 3.47а). Найбільша кількість кореляцій (5 з 6 розрахованих) знайдено для *TGFB1* і *EFNA5*. Найменшу кількість кореляцій показав ген *FOS* лише 2 кореляції. Вивчення коефіцієнтів кореляції з 56 генами/транскриптами з різних функціональних груп показало наявність значущих кореляції для 23 з цих генів (табл. 3.47б). Найбільш цікавим серед усіх генів є ген *TAGLN*, який має найбільшу кількість кореляцій з генами з різних груп. Причому він має негативні кореляції з маркерами раку ПЗ генами *KRT18*, *PSA* та позитивні кореляції з ЕМП та ПАФ (*CDH2*, *FNI*, *ACTA2*).

Дослідження експресії білків *FOS*, *ILB1*, *PLAU*, *TAGLN* та *TGFB1* у пухлинах ПЗ проведено методом імуногістохімії (рис. 3.54-3.58). Ми виявили, що експресія білка *FOS* (рис. 3.54) відрізнялась у аденомах та пухлинах ПЗ:

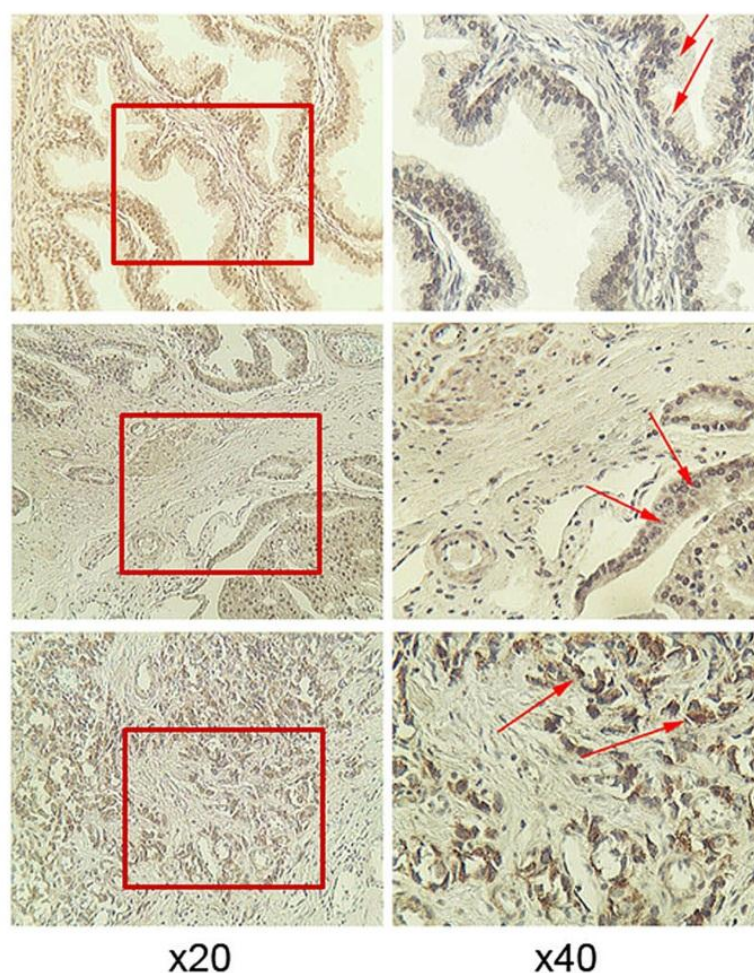


Рис. 3.54. Експресія гена *FOS* на рівні білка у тканинах ПЗ: верхній рядок фото – аденоми, середній – аденокарциноми 1 стадія, нижній – аденокарциноми 4 стадія; x20, x40 – збільшення мікроскопа

імуногістохімічний сигнал білка FOS був більш інтенсивним у пухлинах 4 стадії, порівняно з аденомами ПЗ.

Звертає увагу збільшення коричневого сигналу (наявність досліджуваного білка імуногістохімічним методом) в епітелійних клітинах ПЗ (червоні стрілки). На правій панелі показано збільшене поле, позначене червоним квадратом на лівій панелі.

Вивчення експресії білка IL1B показало, що сигнал був локалізований, ймовірно, на клітинах крові (рис. 3.55). На ньому червоними стрілками показано відсутність коричневого сигналу в аденомах. Коричневий сигнал виявляється, найімовірніше, в клітинах крові в пухлині (зелені стрілки). Більша інфільтрація лімфоцитами була виявлена в низько диференційованій карциномі передміхурової залози, ніж при гіперплазії (аденомі). В епітелійних клітинах передміхурової залози білок ILB1 виявився ледь помітним.

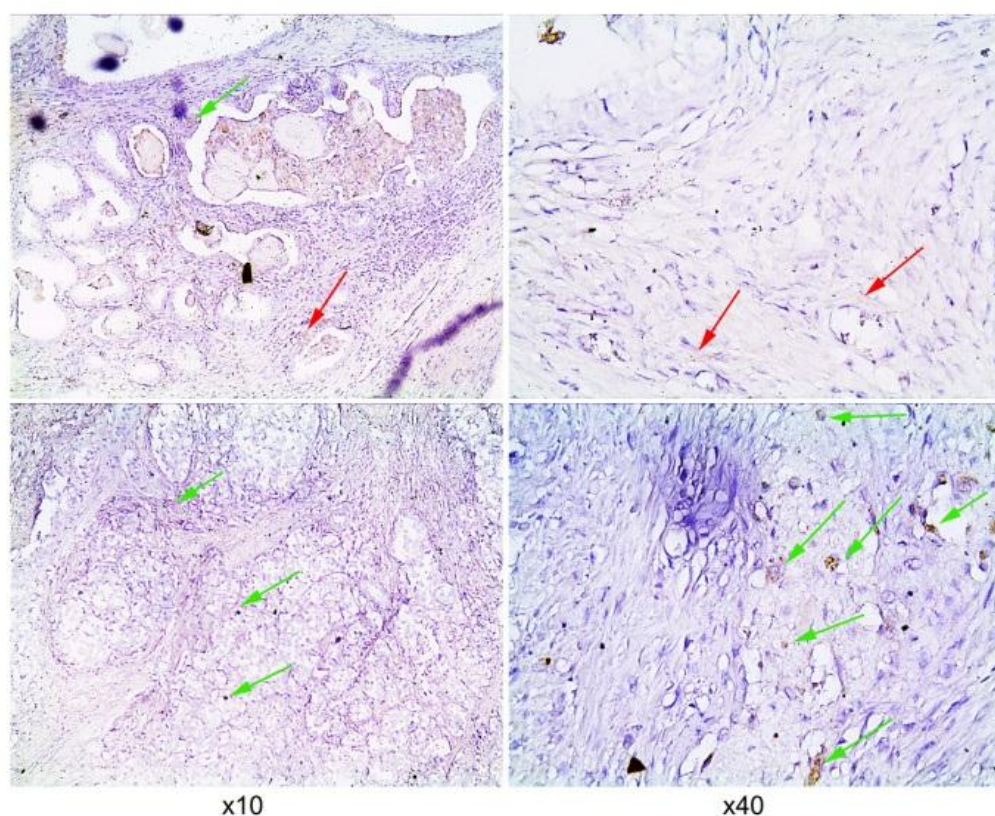


Рис. 3.55. Експресія гена *ILB1* на рівні білка у тканинах ПЗ: верхній рядок – аденоми, нижній – аденокарциноми 4 стадія; x10, x40 – збільшення

Вивчення експресії білка *PLAU* показало картину, протилежну *FOS* - слабкий сигнал *PLAU* у аденомах зник у високорозвинених карциномах (рис. 3.56). Привертає увагу зменшення коричневого сигналу (наявність білка *PLAU*) в епітелію клітинах передміхурової залози (фіолетові стрілки). На правій панелі показано збільшене поле, позначене червоним квадратом на лівій панелі.

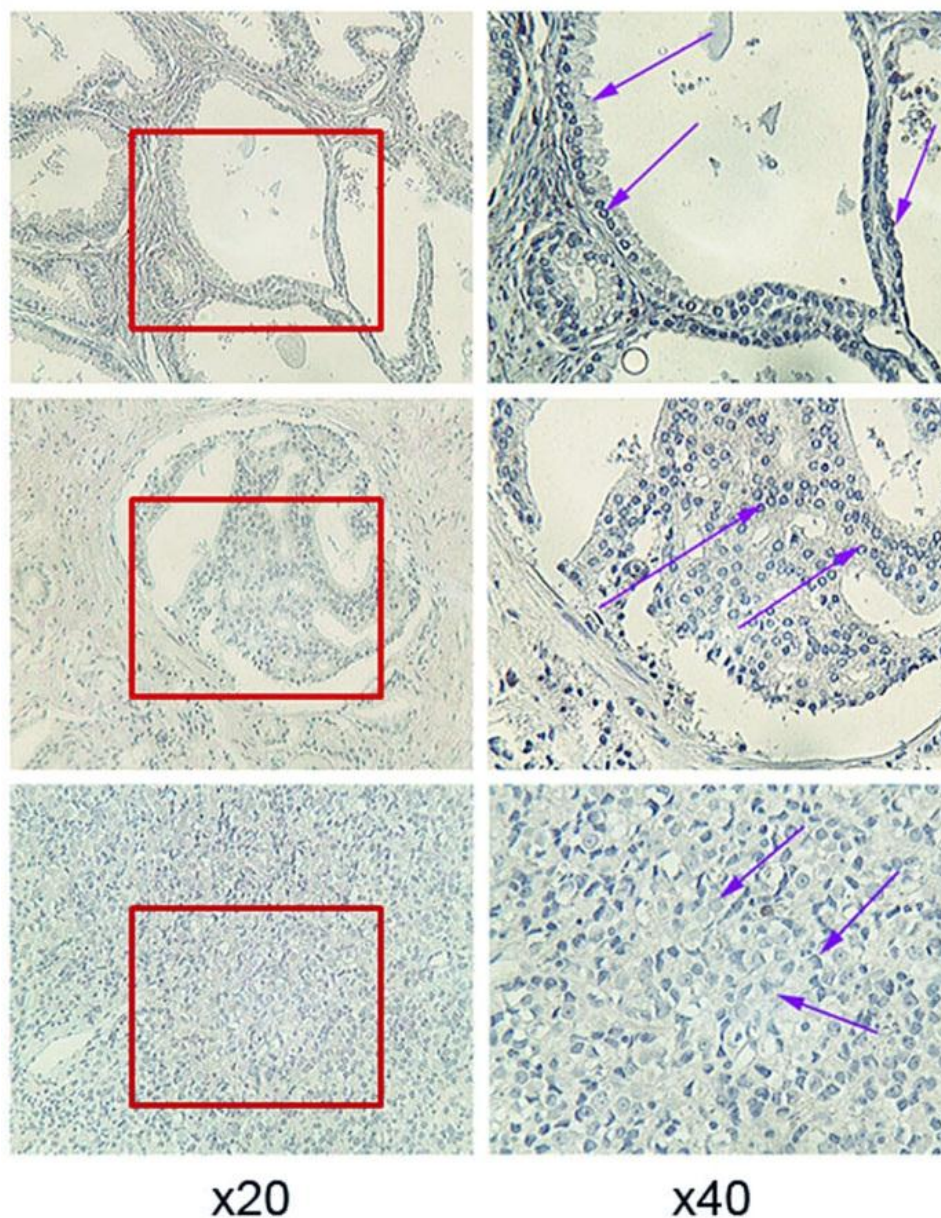


Рис. 3.56. Експресія гена *PLAU* на рівні білка у тканинах ПЗ: верхній рядок фото – аденоми, середній – аденокарциноми 1 стадія, нижній – аденокарциноми 4 стадія; x20, x40 – збільшення мікроскопа

Дослідження експресії білка *TAGLN* показало (рис. 3.57), його специфічну експресію у певних типах клітин. Так, білок *TAGLN* не

визначається у клітинах ПЗ при аденомах (червоні стрілки, верхній рядок). Але він є високо-експресованим у стромальних фіброблестах в аденомах (чорні стрілки, верхній рядок). У зразках раку епітелійні та ракові клітини ПЗ залишалися негативними за TAGLN (середні і нижні рядки фото).

Слід зауважити відсутність коричневого сигналу в епітелійних клітинах ПЗ (червоні стрілки). На правій панелі показано збільшене поле, позначене чорним квадратом на лівій панелі. Слід зазначити, що в цьому випадку клітини

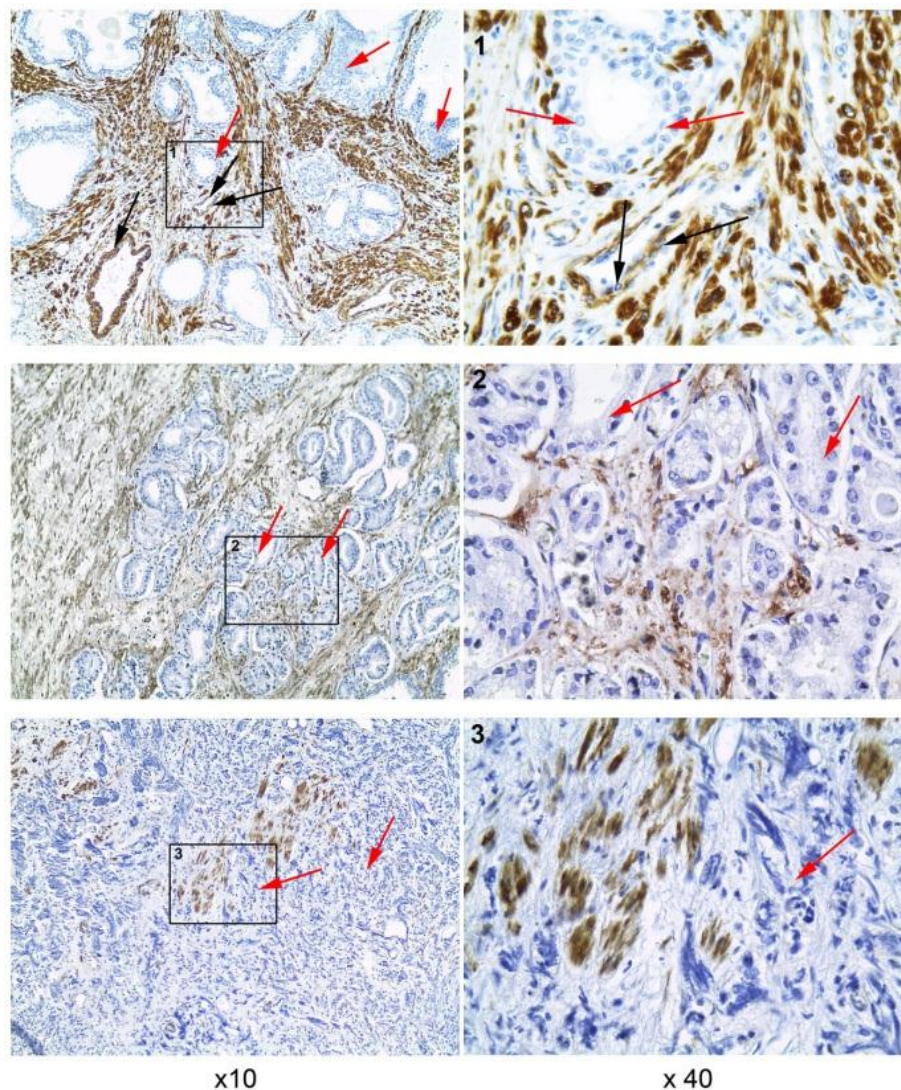


Рис. 3.57. Експресія гена *TAGLN* на рівні білка у тканинах ПЗ: верхній рядок фото – аденоми, середній – аденокарциноми 1 стадія, нижній – аденокарциноми 4 стадія; x10, x40 – збільшення мікроскопа

строми експресують білок TAGLN (чорні стрілки). Внаслідок того, що в пухлинах IV стадії були присутні менше фіброblastів, TAGLN на рівнях мРНК зменшувався, як показано, методом кПЛР.

Вивчення експресії білка TGFB1 у тканинах ПЗ (рис. 3.58) показало досить сильний сигнал імуногістохімічного забарвлення у аденомах (червоні стрілки, верхній рядок). У помірно диференційованих ракових пухлинах (1 стадія) кількість TGFB1 зменшувалась (чорні стрілки, середній рядок). У низько диференційованих пухлинах (4 стадія) білок TGFB1 майже не виявлявся (нижній рядок). Звертає на себе увагу сильний коричневий сигнал (наявність білка TGFB1) в епітелійних клітинах ПЗ у аденомах (червоні стрілки).

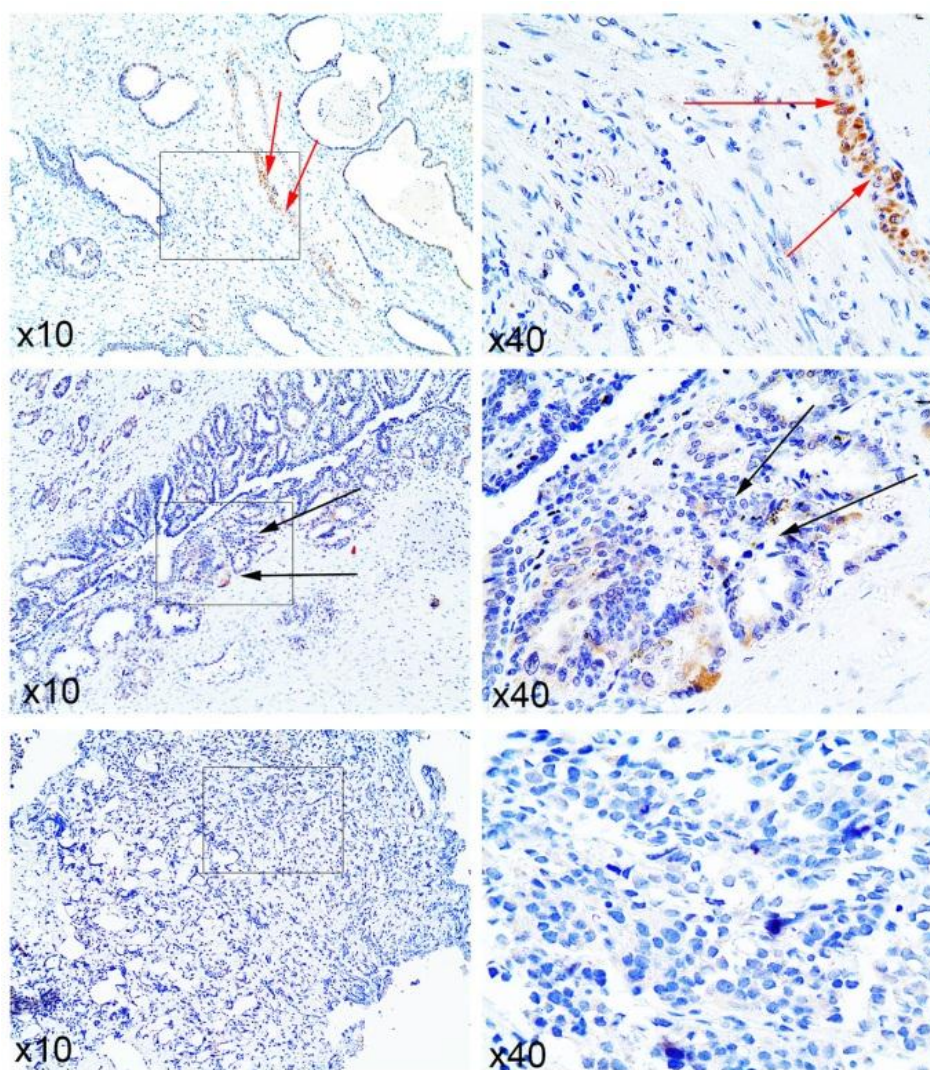


Рис. 3.58. Експресія гена *TGFB1* на рівні білка у тканинах ПЗ: верхній рядок фото – аденоми, середній – аденокарциноми 1 стадія, нижній – аденокарциноми 4 стадія; x10, x40 – збільшення мікроскопа

Слід зазначити, що сигнал білка TGFB1 зменшується в пухлини I стадії (чорні стрілки) і відсутній в пухлини IV стадії. На правій панелі показано збільшене поле, позначене чорним квадратом на лівій панелі. Іншими словами, при розвитку раку передміхурової залози рівні експресії білка TGFB1 поступово зменшуються в клітинах тканини ПЗ.

У табл. 3.48 наведено порівняльний аналіз експресії досліджуваних генів як на рівні мРНК, так і на рівні білка. Співставлення результатів експресії різними методами дає можливість по-перше, побачити дійсно наскільки експресія гена/білка може бути неоднорідною у тканині, що є одним з джерел

Таблиця 3.48.

Узагальнюючі дані експресії семи генів на рівні мРНК та білка

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

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

високої дисперсії даних, по-друге, метод імуногістохімії дає можливість встановити у яких саме типах клітин відбувається експресія того чи іншого білка. Тому співставлення даних імуногістохімії та кореляції експресії між досліджуваними генами та маркерами інших клітин дає певну валідацію та біологічний сенс отриманим результатам. Так, згідно даних ІГХ білки генів *IL1B* та *TAGLN* експресуються у стромальних клітинах та клітинах крові. Значущі позитивні кореляції гена *IL1B* з маркерами ПАФ генами *CTGF*, *HIF1A* та Т-лімфоцитів геном *IRF1*, а у гена *TAGLN* значущі позитивні кореляції з маркерами ЕМП генами *CDH2*, *FNI* й ПАФ генами *ACTA2*, *CTGF* мають підтвердження даними ІГХ. Хоча результати кПЛР та ІГХ співпадають не в усіх випадках, наприклад, за результатами кПЛР ген *TGFBI* має високі рівні ВЕ в усіх групах пухлин, а ІГХ свідчить про зниження експресії білка від аденом до пухлин 1 стадії та відсутність експресії у пухлинах 4 стадії, слід зауважити, що результати мають досить високий рівень дисперсії від пухлини до пухлини. Тобто, щоб робити достовірні висновки, треба вивчити досить велику вибірку зразків.

Тож, наші результатами свідчать, що ІГХ сигнал білка *TGFBI* зменшується при прогресії пухлини. Аналіз кПЛР показав високі рівні дисперсії значень РЕ. Значення мінімуму і максимуму ВЕ мали відмінності понад 100 разів. Звичайно, білок *TGFBI* експресується в різних клітинах. Тому ми не виявили значних змін ВЕ гена *TGFBI* між групами пухлин передміхурової залози.

Білок *IL1B* експресувався аналогічно у всіх пухлинах, але як показали результати ІГХ він ймовірно експресується головним чином гемопоетичними клітинами. Використовуючи кПЛР, неможливо розрізняти типи клітин, але завдяки кореляціям ВЕ з іншими генами маркерами це можна припустити.

Гени *FOS*, *PLAU* і *EPDR1* показують залежність ВЕ від стадії пухлини, СГ і наявності і / або відсутності ГТ *TMPRSS2-ERG*. Ці три гени демонструють диференціальну експресію в двох підтипах аденокарциноми, як показано за допомогою кластерного аналізу. Білки *FOS* і *PLAU* експресуються в клітинах

раку передміхурової залози. Сигнал білка FOS був вище в аденокарциномах порівняно з аденомами. Така ж тенденція була продемонстрована за допомогою кПЛР, коли група аденокарцином порівнювалася з групою аденом. Експресія білка FOS зростала при розвитку пухлини, тобто була вищою при пухлинах на стадії 3-4. Експресія білка PLAУ зменшувалася при тих же умовах як виявлено за допомогою кПЛР і ІГХ. Ген *TAGLN* продемонстрував відмінності ВЕ тільки між групами УНТ з СГ <7 і СГ = 7. ВЕ *TAGLN* мала досить високі рівні дисперсії в аденокарциномах. Білок TAGLN був виявлений в пухлинній стромі, у фібробластах, а не в клітинах передміхурової залози. Ген *EFNA5* показав відмінності ВЕ тільки між УНТ з СГ = 7 і групою аденом.

Узгодження даних експресії на різних рівнях (мРНК і білок) з використанням різних статистичних методів дозволяє зрозуміти і візуалізувати неоднозначні результати експресії досліджуваних генів у зразках раку передміхурової залози.

Отже, нами показана можливість встановлення типу клітин, в яких відбувається експресія генів завдяки об'єднанню імуногістохімічного кореляційного аналізу експресії генів маркерів клітин пухлин та стромальних елементів.

Результати цього підрозділу опубліковані у роботах: [671, 672, 849].

3.6. Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози

3.6.1. Відбір генів для молекулярного профілювання пухлин ПЗ на основі результатів відносної експресії генів. В останні роки все більше робіт направлено на виявлення особливостей та характеристик пухлин ПЗ як на генетичному, епігенетичному, так і транскриптомному рівнях з використанням сучасних технологій мікрочипів та секвенування нового покоління [554, 850]. Впровадження цих методів у клінічну практику та діагностику проблематичне через високу вартість приладів та реактивів. Крім того це пов'язане зі складнощами обробки результатів як величезних масивів даних. В той же час

метод ПЛР у реальному часі дозволяє швидко і набагато дешевше вирішити це завдання, що дозволить надалі розробити тест-системи для профілювання пухлин. Це допоможе у розкритті як механізмів та особливостей канцерогенезу пухлин ПЗ, так і в розумінні перебігу захворювання, уточненні прогнозу та підборі лікування.

Згідно сучасним уявленням [2, 851], пухлинний процес має певні характеристики, які обумовлені не тільки особливостями пухлинних клітин, а й рядом характеристик організму, що відображається на складі мікрооточення пухлин, стані імунної системи та строми органів. Тому для встановлення характеристик конкретної пухлини необхідно враховувати і ці показники.

Щоб вирішити завдання профілювання, треба розуміти складності в отриманні результатів та їх інтерпретації. Одна з них - велика дисперсія експресії генів у пухлинах ПЗ [720, 730, 779]. Це спостерігається завдяки по-перше, гетерогенності самих пухлин [852, 853], по-друге, тим, що в склад пухлин входять клітини різного походження: ракові клітини, нормальні епітелійні клітини, фібробласти та пухлино-асоційовані фібробласти, ендотелійні клітини, лімфоцити, макрофаги та пухлино-асоційовані макрофаги, еритроцити та багато інших, які мають власні рівні експресії генів [854, 855]. Тому пошук генів, що зможуть бути маркерами певних процесів та клітин – дуже складна задача. Найчастіше це неможливо зробити за допомогою одного гена, тоді як сигнатури (набори) здатні виконати цю роль. Тому ми пропонуємо розширити спектр досліджуваних генів для характеристики пухлин ПЗ та використати для молекулярного профілювання не тільки гени, що характеризують злоякісні новоутворення, процес ЕМП та простато-специфічні, гени ліпідного метаболізму, а й гени-маркери фібробластів та ПАФ, маркери лімфоцитів та запалення, маркери макрофагів та ПАМ. Усі гени відібрані нами за даними попередніх досліджень, даними літератури та біоінформативного пошуку [720, 730, 737, 754, 779]. Встановлення показників взаємодії пухлини з організмом та мікрооточення є особливо актуальним у світі активного розвитку сучасних методів імунотерапії.

Профілювання пухлин ПЗ включає декілька етапів. Спочатку необхідно встановити рівні експресії досліджуваних генів та виявити чи є різниця ВЕ між групами злоякісних пухлин та доброякісних пухлин й УНТ. Встановити кореляції між експресією генів й клініко-патологічними показниками (стадією захворювання, СГ, концентрацією ПСА, віком, тощо) у аденокарциномах ПЗ та кореляції між експресією генів. Після цього слід відібрати гени, що мають значущі зміни у пухлинах та мають кореляції з вказаними показниками.

Нами встановлено рівні ВЕ 59 транскриптів (табл. 3.49), що відносяться до різних функціональних груп генів. До маркерів пухлин ПЗ та ЕМП відносяться гени 1-19. Гени, що асоційовані з раком ПЗ та мають важливі функції у чутливості до стероїдних та пептидних гормонів (гени 20-32). Наступні гени 33-54 є маркерами стану строми ПЗ, імунної системи, мікрооточення пухлин і гени ліпідного метаболізму, що грають важливу у синтезі стероїдних гормонів, розвитку пухлин та метастазуванні [856, 857].

Після проведення статистичного аналізу ВЕ як парних П/Н зразків, так і груп (П, Н, А) виявлено статистично значущі різниці ВЕ для 35 генів з 59 між групами аденокарциномам та аденомам або УНТ. З них 14 генів мають достовірні відмінності ВЕ між П та парними Н. 33 гени мають відмінності ВЕ між групами Т та А, та 8 генів мають відмінності ВЕ між групами П та Н.

Наявність різниці у кількості генів більш ніж у 2 рази, що мають відмінності ВЕ між П/Н та П/А підтверджує висунуте нами раніше припущення, що умовно-нормальні тканини від пацієнтів з раком ПЗ не є адекватним контролем [720, 737, 779]. Це підтверджує наявність ГТ *TMPRSS2-ERG* у Н практично з такою ж частотою, як і в П [695]. В той же час ці показники мають статистично значущі відмінності у групі аденом ПЗ у порівнянні як з П, так і з Н.

Таблиця 3.49.

Відмінності ВЕ генів/транскриптів між групами П, Н та А

№	Ген/ транскрипт	Маркер епітелі- альних клітин	Маркер раку ПЗ	Маркер фіброблас- тів, клітин імунної системи, запалення	Різниця ВЕ між парами П/Н p<0,05*	Різниця ВЕ між групами П/А p<0,05**	Різниця ВЕ між групами П/Н p<0,05**
1	<i>AR (1 isof)</i>	*				p=0,021	
2	<i>CASP3</i>		*				
3	<i>CDH1</i>	*					
4	<i>CDH2</i>		*	*			
5	<i>FN1</i>		*	*			
6	<i>KRT18</i>	*	*		p<0,001	p=0,001	p=0,018
7	<i>MKI67</i>		*		p=0,017		
8	<i>MMP2</i>		*		p=0,011		
9	<i>MMP9</i>		*		p=0,014	p=0,001	
10	<i>NKX3-1</i>	*					
11	<i>OCLN</i>	*					
12	<i>PSA</i>	*	*				
13	<i>PTEN</i>	*				p=0,015	
14	<i>TMPRSS2:ERG</i>		*		p=0,003	p=0,010	
15	<i>VIM</i>		*	*	p=0,009	p=0,007	
16	<i>XIAP</i>		*				
17	<i>PCA3[#]</i>		*			p=0,001	
18	<i>HOTAIR[#]</i>		*		p=0,007	p<0,001	p=0,047
19	<i>SCHLAPI[#]</i>		*			p=0,013	
20	<i>ESR1</i>		*	*	p=0,010	p<0,001	
21	<i>ESR2</i>	*	*				
22	<i>GCR</i>		*			p=0,030	
23	<i>INSR A</i>	*	*				
24	<i>INSR B</i>	*	*		p=0,037		
25	<i>IGF1R</i>		*				
26	<i>IGF1R tr</i>		*				
27	<i>MSMB</i>	*					

Продовж. табл. 3.49.

№	Ген/ транскрипт	Маркер епітелі- альних клітин	Маркер раку ПЗ	Маркер фіроблас- тів, клітин імунної системи, запалення	Різниця ВЕ між парами П/Н p<0,05*	Різниця ВЕ між групами П/А p<0,05**	Різниця ВЕ між групами П/Н p<0,05**
28	<i>PRLR</i>	*	*			p=0,004	
29	<i>PRL</i>		*				
30	<i>SRD5A1</i>	*					
31	<i>SRD5A2</i>	*				p<0,001	
32	<i>VDR</i>	*				p=0,050	
33	<i>THY1</i>			*		p=0,011	
34	<i>ACTA2</i>			*			
35	<i>CXCL12</i>			*		p<0,001	
36	<i>CXCL14</i>			*	p=0,002	p<0,001	p=0,025
37	<i>CTGF</i>			*	p=0,005	p<0,001	
38	<i>HIF1A</i>			*		p=0,008 &	
39	<i>SI00A4</i>			*			
40	<i>FAP</i>			*	p=0,021	p=0,015	
41	<i>CIAS</i>			*			
42	<i>CTLA4</i>			*		p=0,016	
43	<i>KLRK</i>			*			
44	<i>IRF1</i>			*			
45	<i>IL1RL1</i>			*		p=0,051	
46	<i>IL1R1</i>			*	p=0,049	p=0,004	
47	<i>IL2RA</i>			*			
48	<i>HLA G</i>			*			
49	<i>CD68</i>			*			
50	<i>CD163</i>			*		p=0,005 &	p=0,049 &
51	<i>CCR4</i>			*		p=0,002	
52	<i>CCL17</i>			*		p=0,015	
53	<i>CCL22</i>			*		p=0,038 &	
54	<i>NOS2A</i>			*	p=0,013	p=0,05 &	p=0,007 &

Продовж. табл. 3.49.

№	Ген/ транскрипт	Маркер епітелі- альних клітин	Маркер раку ПЗ	Маркер фіброблас- тів, клітин імунної системи, запалення	Різниця ВЕ між парами П/Н p<0,05*	Різниця ВЕ між групами П/А p<0,05**	Різниця ВЕ між групами П/Н p<0,05**
55	<i>FASN</i>		*			p=0,031	
56	<i>CPT1C</i>		*				
57	<i>LDLR</i>		*				p=0,019 &
58	<i>HMGCR</i>		*			p=0,021 &	
59	<i>COX2</i>		*			p=0,019	

Примітки: 1. * - парний тест Вілкоксона з FDR=0,2; 2. ** - тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь, FDR=0,2; 3. & - наявність достовірної різниці між групами при врахуванні стадій захворювання; 4. # - довгі некодувальні РНК; 5. 1-19 – гени, що пов'язані з раком ПЗ та ЕМП; 6. 20-32 – простато-специфічні гени; 7. 33-40 – гени, пов'язані з експресією фібробластів та пухлино-асоційованих фібробластів; 8. 41-48 – гени, пов'язані із запаленням, лімфоцитами; 9. 49-54 – гени, пов'язані з макрофагами та пухлино-асоційованими макрофагами; 10 55-59 – гени ліпідного метаболізму

Гени, що не мають статистично значущих відмінностей між ВЕ у досліджених групах, можуть бути корисними при проведенні кластеризації та допоможуть розділити пухлини ПЗ на групи з унікальним профілем експресії [720]. Наприклад, для генів *PSA* та *NKX3-1* не знайдено жодних відмінностей між групами і ці гени мають досить великий діапазон експресії у аденокарциномах, тобто, є пухлини з високим та низьким рівнем ВЕ, які, вірогідно, можуть відноситись до різних молекулярних підтипів [720, 730, 850].

Встановлення кореляції за Спірменом між експресією генів у аденокарциномах передміхурової залози та клініко-патологічними характеристиками показало наявність значущих кореляцій у 30 з 59 досліджених генів/транскриптів (табл. 3.50) з FDR=0,25. Виявлено 15 з 30 генів, що мають кореляції, характеризують мікрооточення пухлин та стан імунної

системи. Максимальну кількість кореляцій (по 3 з СГ, стадією та рівнем ПСА) мають 2 гени: *SRD5A2* та *VDR*. Причому обидва гени мають негативні кореляції із клініко-патологічними характеристиками, що свідчить про втрату експресії цих генів при прогресуванні пухлин ПЗ. Самі високі значення r^s ВЕ та стадії раку ПЗ мають гени *CD163* ($r^s= 0,615$) та *HIF1A* ($r^s= -0,538$).

Таблиця 3.50.

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

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

Примітки: 1. $p < 0,05$ – червоний курсив; 2. $p < 0,01$ – червоний жирний

Низка генів, що не має значущих кореляцій з клініко-патологічними показниками або не мають важливого значення в канцерогенезі ПЗ, або їх аберації відбуваються на ранніх стадіях ракової трансформації клітин та визначають певний молекулярний тип пухлини, як наприклад наявність гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG*, втрата експресії *PTEN* або *NKX3-1* [219,235, 431].

Крім того, гени, що не мають відмінностей у частоті порушень між групами пухлин ПЗ з різними стадіями та СГ (тобто відсутні кореляції з

клініко-патологічними характеристиками), але для них виявлені важливі функції у канцерогенезі, можуть бути потенційними молекулярними характеристиками пухлин ПЗ. В нашому дослідженні такими характеристиками можуть бути рівні BE *PTEN* та наявність ГТ *TMPRSS2-ERG*.

Отримані результати є основою для розробки набору молекулярного профілювання пухлин передміхурової залози, який дозволить оцінити як стан пухлин ПЗ, так і мікрооточення та імунної системи.

3.6.2. Експресія гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* як молекулярна характеристика пухлин передміхурової залози. Важлива молекулярна характеристика пухлин ПЗ – це наявність гібридних транскриптів. Нами виявлено у дослідній вибірці пухлин ГТ *TMPRSS2-ERG*, який експресується у 21 з 37 аденокарцином та більшості парних УНТ (табл. 3.51) [695].

Базуючись на результатах наших досліджень та даних літератури, ми вирішили дослідити чи є якісь особливі відмінності у експресії простато-специфічних та ЕМП-пов'язаних генів у пухлинах ПЗ з різним статусом за показником наявності гібридного транскрипта, тобто різниця BE генів між ГТ-позитивними та ГТ-негативними пухлинами ПЗ. Враховуючи той факт, що поява ГТ може бути ознакою для поділу на молекулярні підтипи пухлин ПЗ [730, 858].

Досліджувані парні зразки аденокарцином/УНТ за наявністю ГТ *TMPRSS2-ERG* поділяються на 3 групи: 1) П-/Н- група – ГТ *TMPRSS2-ERG* транскрипт не виявлено ні в аденокарциномах, ні в УНТ (n=16); 2) П+/Н+ група – ГТ *TMPRSS2-ERG* був виявлений у обох випадках: аденокарциноми і УНТ (n=16); 3) П+/Н- група – ГТ *TMPRSS2-ERG* транскрипт був присутній в аденокарциномах, але не в УНТ (n=5). Проведений парний тест Вілкоксона для моделі 2^{-dCt} показав відмінності BE у 7 генах, між парними аденокарциноми (П) і УНТ (Н) з урахуванням ГТ-статусу *TMPRSS2-ERG*. Ці дані наведені у табл. 3.52 з порівнянням даних парних П/Н (37 пар) без урахування ГТ (загалом 9 генів).

Таблиця 3.51.

КПХ та ГТ-статус досліджуваних аденокарцином ПЗ

№ зразка	ЗТ	Стадія	СГ	TNM	ПСА нг/мл	№ зразка	ЗТ	Стадія	СГ	TNM	ПСА нг/мл
1	-	II	<7	T2bN0M0	12,8	21	-	III	>7	T3bNxM0	86,3
2	-	II	<7	T2cNxM0	27,3	22	-	IV	>7	T3aN0M1	37,8
3	-	III	<7	T3bNxM0	23,6	23	-	IV	>7	T2cN0M1	22,6
4	-	II	<7	T2bNxM0	6,5	24	-	III	>7	T2cN1M0	2,3
5	-	II	<7	T2cNxM0	25,2	25	-	II	>7	T2bNxM0	6,9
6	+	II	<7	T2aNxM0	18,6	26	-	III	>7	T3bNxM0	51
7	+	II	<7	T2aN0M0	9,3	27	-	III	>7	T2bNxM0	0,5
8	+	II	<7	T2aN0M0	6	28	-	II	>7	T2bN0M0	20,3
9	+	II	<7	T2pN0M0	5	29	+	II	>7	T2cN0M0	9,7
10	+	II	<7	T2aN0M0	13,3	30	+	III	>7	T3bN0M0	12,1
11	+	II	<7	T2cN0M0	29,1	31	+	III	>7	T3aN0M0	25,1
12	-	II	7	T2aNxM0	11,7	32	+	III	>7	T3bNxM0	16
13	-	II	7	T2cNxM0	13,9	33	+	III	>7	T3bN0M0	84,2
14	-	II	7	T2cNxM0	19,8	34	+	III	>7	T3bNxM0	20,9
15	+	II	7	T2aNxM0	7,1	35	+	IV	>7	T2cN1M0	17
16	+	I	7	T1cNxM0	8,2	36	+	II	>7	T2bNxM0	33
17	+	II	7	T2cNxM0	19,3	37	+	III	>7	T3bNxM0	106
18	+	II	7	T2aNxM0	5,6						
19	+	II	7	T2cN0M0	14,3						
20	+	III	7	T2bN0M0	24,6						

Примітки: 1. “+” - наявність ГТ *TMPRSS2-ERG* у зразку пухлин (ГТ-позитивний статус); 2. “-” відсутність ГТ *TMPRSS2-ERG* у зразку пухлин (ГТ-негативний статус)

З 9-и генів, які мали значущі різниці ВЕ між парними П/Н, два не мають різниці між групами з встановленим ГТ-статусом: гени *MMP2*, *VIM*, а один ген - *PCAZ* не має різниці між парними П/Н.

У п'яти генів з семи, що мають значущі різниці ВЕ, спостерігають відмінності ВЕ лише у ГТ-позитивних аденокарциномах та УНТ: *ESR1* ($p = 0,038$), *KRT18* ($p = 0,007$), *MKI67* ($p = 0,003$), *MMP9* ($p = 0,011$) та *PCAZ* ($p = 0,049$). Крім того ген *ESR1* має також значущу різницю між ГТ-позитивними аденокарциномами та ГТ-негативними УНТ ($p=0,043$). Два інших гени зі встановленими змінами мають їх між ГТ-негативними П/Н: *INSRB* ($p = 0,039$) та *HOTAIR* ($p = 0,027$).

Таблиця 3.52.

Зміни BE генів у парних зразках аденокарцином/УНТ без встановлення наявності ГТ та у групах з встановленим ГТ-статусом

Ген	Пари груп з відмінностями без ГТ-статусу	p-рівні ^{&}	Пари груп з відмінностями з урахуванням ГТ-статусу	p-рівні ^{&}
<i>ESR1</i>	П/Н	0,010	П+/Н+	0,038
			П+/Н-	0,043
<i>INSRB</i>	П/Н	0,037	П-/Н-	0,039
<i>KRT18</i>	П/Н	0,000	П+/Н+	0,007
<i>MKI67</i>	П/Н	0,017	П+/Н+	0,003
<i>MMP2</i>	П/Н	0,011	-	-
<i>MMP9</i>	П/Н	0,014	П+/Н+	0,011
<i>VIM</i>	П/Н	0,010	-	-
<i>HOTAIR</i>	П/Н	0,007	П-/Н-	0,027
<i>PCAZ</i>	-	-	П+/Н+	0,049

Примітка. [&] - p-рівні за парним тестом Вілкоксона з FDR=0,2

Аналіз даних за допомогою 2^{-ddCt} моделі, дав можливість виявити 6 генів зі значущими відмінностями між П/Н між аденокарциномами та УНТ (табл. 3.53).

Три гени (*MMP9*, *MKI67* та *SCHLAP1*), мали підвищенні рівні BE у ГТ-позитивних пухлинах, у порівнянні з ГТ-позитивними УНТ (група П+/Н+) ($p < 0,05$). Для двох генів: *ESR1* та *HOTAIR* виявлено збільшення BE як у П+/Н+, так і в П-/Н- групах ($p < 0,05$). Тільки один ген, *PCAZ* мав значно збільшений рівень BE в усіх ГТ-позитивних аденокарциномах П+/Н+ та П+/Н- групах ($p < 0,05$).

Отже, дані, отримані за двома вищезгаданими моделями, лише частково перекриваються. Це може бути пов'язано з особливостями протоколів статистичних розрахунків.

Таблиця 3.53.

Частота змін ВЕ у парних П/Н з різним ГТ-статусом за моделями 2[^]-ddCt та 2[^]-dCt

Група	п	Зміни ВЕ к.р.	AR 1 isof	AR 2 isof	ESR1	ESR2	GCR AG	GCR ins AG	GCR ins B	INSRA	INSRB	IGFIR	IGFIR tr	PRLR	PRL	VDR	SRD5A1	SRD5A2	
1	П-/Н-	16	<0,49	1	4	3	2	0	1	0	0	0	1	3	4	4	3	2	1
			>2,10	1	2	7 ^{\$}	4	0	0	2	2	4 [#]	2	1	1	2	1	0	0
2	П+/Н+	16	<0,49	3	2	1	3	0	1	1	3	0	3	1	1	0	2	3	4
			>2,10	1	2	9 ^{\$#}	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	3	2	1
3	П+/Н-	5	<0,49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
			>2,10	0	1	3 [#]	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1

Група	п	Зміни ВЕ к.р.	CDH1	CDH2	FN1	VIM	OCN	MMP2	MMP9	NKX3.1	PSA	KRT18	MKI67	CASP3	XIAP	PCSA3	HOTAIR	SCHLAPI	
1	П-/Н-	16	<0,49	4	2	3	1	2	0	1	6	5	2	3	1	0	6	2	6
			>2,10	0	3	3	3	3	1	5	1	3	2	2	0	2	4	9 ^{\$#}	6
2	П+/Н+	16	<0,49	5	6	0	0	3	1	0	5	2	0	1	1	0	4	2	3
			>2,10	0	2	2	3	4	3	9 ^{\$#}	2	1	5 [#]	7 ^{\$#}	2	0	9 ^{\$#}	7 ^{\$}	7 ^{\$}
3	П+/Н-	5	<0,49	1	2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
			>2,10	2	0	0	1	2	0	1	1	1	1	2	0	0	4 ^{\$}	1	2

Примітки: 1. к.р. – кількість разів; 2. \$ - статистично значущі зміни за точним тестом Фішера ($p < 0.05$) (2[^]-ddCt) з FDR=0,1; 3. # - статистично значущі зміни за парним тестом Вілкоксона ($p < 0.05$) (2[^]-dCt) з FDR=0,1

Раніше ми вже акцентували на тому, що УНТ у пацієнтів із пухлинами передміхурової залози не є нормальною тканиною за молекулярними показниками, тому їх не можна вважати адекватним контролем [720]. Тому паралельно ми використовували аденоми у якості контрольної групи. Слід звернути увагу, що ГТ *TMPRSS2-ERG* був також виявлений у 4 аденомах. Ми перевірили рівні ВЕ генів цих аденом у порівнянні з ГТ-негативними аденомами і не знайшли значущих відмінностей ВЕ між цими групами аденом. Але, для подальших досліджень ми виключили ці зразки з групи аденом і у наступних порівняннях використано лише зразки аденом без ГТ (n = 17). Крім того, зразки УНТ без ГТ (n = 5) з пар аденокарциноми з наявністю ГТ були

віднесені до загальної ГТ-негативної (Н-) групи УНТ після перевірки відмінностей ВЕ у групах зразків УНТ для всіх досліджених генів між аденокарциномами, УНТ та аденомами.

Тест Краскела-Уолліса з $FDR = 0,1$ показав значні відмінності ВЕ у 11 з 33 транскриптів / генів між 5 дослідженими групами (П+, П-, Н+, Н- та А-). Наступний тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь підтвердив зміни тільки для 9 транскриптів / генів (табл. 3.54, рис. 3.59-3.60).

Таблиця 3.54.

Відмінності ВЕ генів між парами груп з різним ГТ-статусом

Ген/ транскрипт	р- рівні *	Пари з відмінностями ВЕ	р-рівні **
<i>AR</i> (2 isof)	0,024	П-/А	0,017
<i>ESR1</i>	<0,001	П-/А	0,002
		П+/А	<0,001
		Н-/А	0,040
<i>PRLR</i>	0,017	П-/А	0,009
<i>SRD5A2</i>	0,002	П-/А	0,039
		П+/А	0,003
		Н+/А	0,020
<i>KRT18</i>	0,007	П+/А	0,008
<i>MMP9</i>	0,001	П-/А	0,003
		Н-/А	0,012
<i>OCLN</i>	0,021	-	-
<i>VIM</i>	0,045	-	-
<i>PCA3</i>	0,001	П+/А	0,001
		Н+/А	0,001
<i>HOTAIR</i>	0,003	П-/А	0,002
<i>SCHLAPI</i>	0,010	П+/А	0,011

Примітка. ** - значущі відмінності за тестом Дана-Бонферроні.

Підвищені рівні ВЕ в групах аденокарцином та УНТ в порівнянні з групою аденом виявлено для 6 генів: 1) *ESR1* П-/А- ($p = 0,002$), П+/А- ($p < 0,001$), Н-/А- ($p = 0,040$); 2) *KRT18* П+/А- ($p = 0,008$); 3) *MMP9* П-/А- ($p = 0,003$),

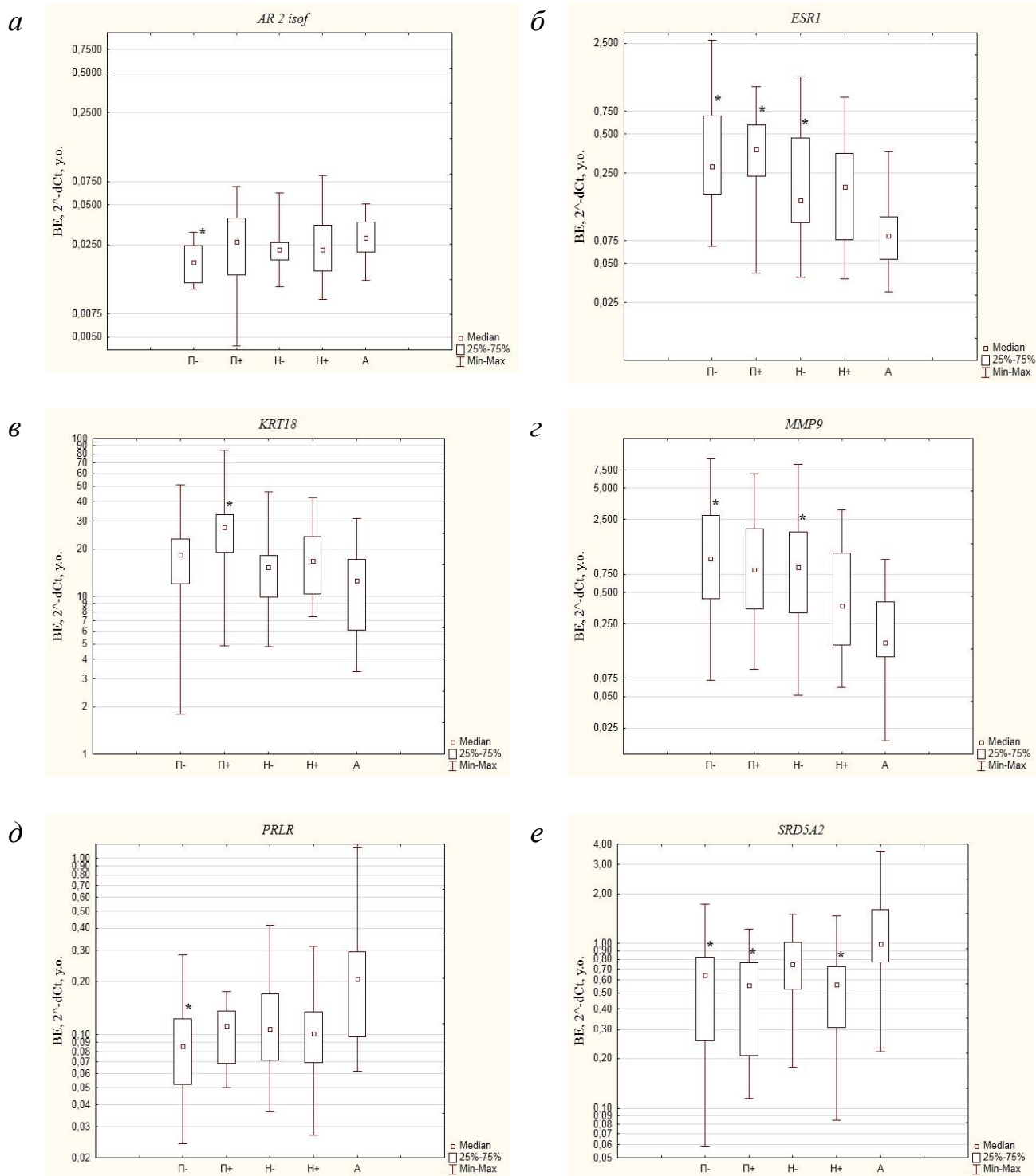


Рис. 3.59. Коробкові діаграми BE генів зі значущими відмінностями між 5-ма групами зразків з урахуванням ГТ-статусу: * - $p < 0,05$ у порівнянні з групою аденом (А) за даними тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

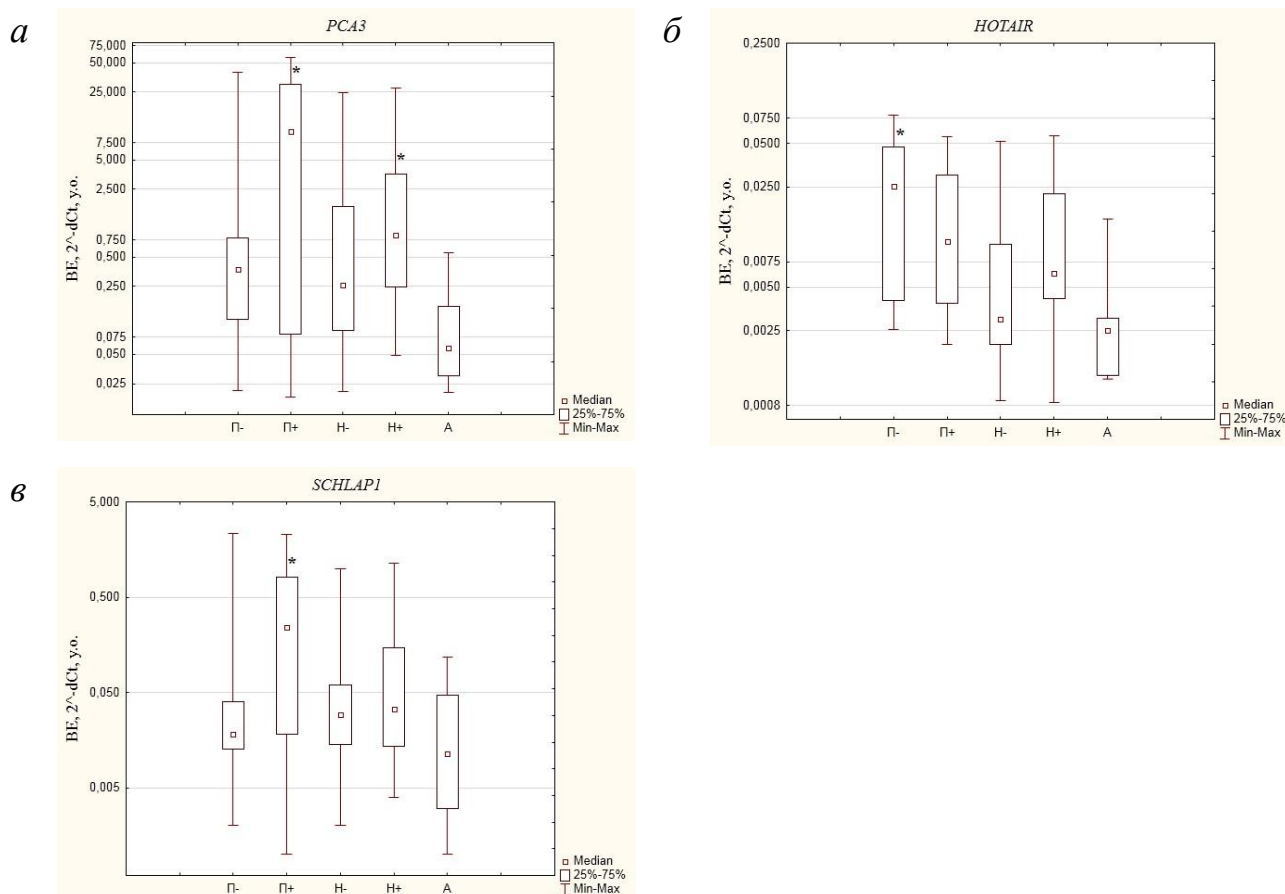


Рис. 3.60. Коробкові діаграми BE генів довгих некодувальних РНК зі значущими відмінностями між 5-ма групами зразків з урахуванням ГТ-статусу. * - $p < 0,05$ у порівнянні з групою аденом (А) за даними тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь.

Н-/А- ($p = 0,012$); 4) *PCA3* П+/А- ($p = 0,001$), Н+/А- ($p = 0,001$); 5) *HOTAIR* П-/А- ($p = 0,002$) та 6) *SCHLAP1* П+/А- ($p = 0,011$).

У 3 генах виявлено зниження рівнів BE у групах П та УНТ порівняно з групою аденом: 1) *AR 2 isof* П- / А- ($p = 0,0172$); 2) *PRLR* П- / А- ($p = 0,0088$) і 3) *SRD5A2* П- / А- ($p = 0,0393$), П + / А- ($p = 0,0034$), Н + / А- ($p = 0,0203$).

Деякі з цих 9 генів мають диференційну експресію генів у ГТ-позитивних та ГТ-негативних пухлинах. Так, чотири гени мають відмінності BE лише в ГТ-негативних аденокарциномах (*AR 2 isof*, *PRLR*, *MMP9*, *HOTAIR*), а три гени *KRT18*, *PCA3*, *SCHLAP1* мають відмінності BE у порівнянні з аденомами лише у ГТ-позитивних аденокарциномах. Гени *ESR1* та *SRD5A2* хоч і мають відмінності BE між аденокарциномами та аденомами, але вони є як для ГТ-

позитивних, так і для ГТ-негативних аденокарцином, тобто ГТ-статус не грає ролі ознаки для змін ВЕ цих генів. Ще більш достовірні зміни могли б бути, якщо ВЕ між ГТ- позитивними та ГТ-негативними аденокарциномами мали б місце. Але, нажаль, таких ознак поки що не виявлено.

Вивчення рангових кореляцій за Спірменом між ВЕ ГТ та КПХ пухлин не виявило значущих кореляцій, але знайдено позитивні та негативні кореляції між ВЕ ГТ *TMPRSS2-ERG* та простато-специфічними та ЕМП-пов'язаними генами. Дані наведено у табл. 3.55. Найбільш значущі кореляції, причому усі позитивні, між ВЕ ГТ знайдено для генів *AR 2 isof* ($r^s=0,486$, $p<0,01$), *KRT18* ($r^s=0,449$, $p<0,01$), *OCLN* ($r^s=0,467$, $p<0,01$).

Ще 8 значущих кореляцій з яких 6 позитивних з $p<0,05$ винайдено для генів: *AR 1 isof* ($r^s=0,331$, $p<0,05$), *IGF1R* та *IGF1R tr* ($r^s=0,349$, $p<0,05$ та $r^s=0,332$, $p<0,05$ відповідно), *PSA* ($r^s=0,338$, $p<0,05$), *PCA3* ($r^s=0,344$, $p<0,05$),

Таблиця 3.55.

Коефіцієнти рангової кореляції (r^s) за Спірменом для ВЕ ГТ *TMPRSS2-ERG* та досліджуваних генів у аденокарциномах ПЗ

Ген/ транскрипт	<i>AR 1 isof</i>	<i>AR 2 isof</i>	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>GCR AG</i>	<i>GCR ins AG</i>	<i>GCR ins B</i>	<i>INSRA</i>	<i>INSRB</i>	<i>IGF1R</i>	<i>IGF1R tr</i>	<i>PRLR</i>	<i>PRL</i>	<i>VDR</i>	<i>SRD5A1</i>	<i>SRD5A2</i>
<i>TMPRSS2-ERG</i>	0,331	0,486	0,156	-0,294	-0,118	-0,239	-0,007	0,074	-0,367	0,349	0,332	0,097	-0,314	-0,001	0,194	-0,222

Ген/ транскрипт	<i>CDH1</i>	<i>CDH2</i>	<i>CASP3</i>	<i>FNI</i>	<i>KRT18</i>	<i>OCLN</i>	<i>MKI67</i>	<i>MMP2</i>	<i>MMP9</i>	<i>NKX3.1</i>	<i>PSA</i>	<i>VIM</i>	<i>XIAP</i>	<i>PCA3</i>	<i>HOTAIR</i>	<i>SCHLAP1</i>
<i>TMPRSS2-ERG</i>	0,125	-0,358	-0,045	-0,250	0,449	0,467	0,317	-0,141	-0,027	0,231	0,338	-0,235	0,077	0,344	-0,290	0,338

Примітки: 1. $p<0,05$ - червоний; 2. $p<0,01$ – червоний жирний

SCHLAP1 ($r^s=0,338$, $p<0,05$). Два гени, що мають негативні кореляції з ВЕ ГТ *TMPRSS2-ERG* у аденокарциномах: *INSRB* ($r^s=-0,367$, $p<0,05$) та *CDH2* ($r^s=-0,358$, $p<0,05$).

Серед генів ліпідного метаболізму (табл. 3.56.) значущу кореляцію з ВЕ ГТ має лише ген *FASN* ($r^s=0,416$, $p<0,05$).

Таблиця 3.56.

Коефіцієнти рангової кореляції (r^s) за Спірменом для ВЕ ГТ *TMPRSS2-ERG* та генів ліпідного метаболізму у аденокарциномах ПЗ

Genes	<i>FASN</i>	<i>CPT1C</i>	<i>LDLR</i>	<i>HMGCR</i>	<i>COX2</i>
<i>TMPRSS2-ERG</i>	0,416	-0,173	0,215	0,071	-0,317

Примітка. $p<0,05$ – курсив.

Такі ж дослідження по вивченню впливу наявності експресії гібридного транскрипта на ВЕ генів ми провели і для генів маркерів пухлинного мікрооточення передміхурової залози.

В залежності від наявності гібридного транскрипта (табл. 3.57) (ГТ-статус) у ПНА групах виявлено статистично-значущі відмінності між досліджуваними групами для 10 з 23 генів груп ПАФ, ПАМ та ІАГ.

Таблиця 3.57.

Відмінності ВЕ між парами ПНА груп з різним ГТ- статусом

ПНА/ГТ-статус			ПНА/ГТ-статус		
Гени	Групи зразків	p -рівні*	Гени	Групи зразків	p -рівні*
<i>THY1</i>	П-/А	0,0497	<i>CTGF</i>	П-/А	0,0211
<i>CXCL12</i>	П-/А	0,0178		<i>FAP</i>	П+/А
	П+/А	0,0000	П-/Н+		0,0280
	Н-/А	0,0281	<i>CTLA4</i>	Н-/А	0,0419
	Н+/А	0,0001		Н-/А	0,0010
<i>CXCL14</i>	П-/А	0,0000	<i>CD163</i>	Н-/Н+	0,0309
	П+/А	0,0001	<i>CCR4</i>	П-/А	0,0195
	Н-/А	0,0021		Н+/А	0,0455
	П-/Н+	0,0256	<i>CCL17</i>	Н-/А	0,0225
			<i>CCL22</i>	Н-/А	0,0134

Примітки: 1. * - відмінності за тестом Дана-Бонфероні для множинних порівнянь з FDR=0,2; 2. "+" та "-" - наявність або відсутність гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG*

Згідно тесту Дана-Бонферроні 10 генів мають 19 пар груп зі статистично значущими відмінностями ВЕ. Але тільки три гени мають відмінну ВЕ між ГТ-позитивними та ГТ-негативними аденокарциномами й аденомами. Це гени *THY1*, *FAP* та *CCR4*, які мають значущі різниці ВЕ між групою ГТ-негативних аденокарцином та аденом.

Дослідження коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом ВЕ генів маркерів ПАФ, ПАМ ІАГ та ВЕ гібридного транскрипта (табл. 3.58) показало лише 2 значущих негативних кореляції з ВЕ ГТ *TMPRSS2-ERG* генів ПАФ: *ACTA2* ($rs=-0,406$, $p<0,05$) та *CXCL12* ($rs=-0,415$, $p<0,05$) на відміну від генів

Таблиця 3.58.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) ВЕ генів ПАФ, ПАМ, ІАГ та ВЕ гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG*.

ПАФ

Ген/транскрипт	<i>ACTA2</i>	<i>CTGF</i>	<i>CXCL12</i>	<i>CXCL14</i>	<i>HIF1A</i>	<i>FAP</i>	<i>S100A4</i>	<i>THY1</i>
<i>TMPRSS2-ERG</i>	-0.406	-0.126	-0.415	0.155	0.090	-0.123	-0.176	-0.157

ПАМ

Ген/ транскрипт	<i>CD68</i>	<i>CD163</i>	<i>CCL17</i>	<i>CCL22</i>	<i>CCR4</i>	<i>NOS2A</i>
<i>TMPRSS2-ERG</i>	-0.106	-0.143	0.051	0.129	0.090	-0.019

ІАГ

Ген/ транскрипт	<i>C1AS</i>	<i>CTLA4</i>	<i>HLA-G</i>	<i>IL1R1</i>	<i>IL1RL1</i>	<i>IL2RA</i>	<i>IRF1</i>	<i>KLRK</i>	<i>MSMB</i>
<i>TMPRSS2-ERG</i>	-0.114	-0.082	-0.042	0.130	-0.017	0.095	0.066	0.113	0.098

Примітка. $p<0.05$ – жирний курсив

асоційованих з ЕМП та пов'язаних с раком ПЗ, які мають набагато більше кореляцій з ВЕ гібридного транскрипта. Згідно отриманих даних можна припустити або про різне походження клітин, у яких експресуються ці гени, а це так і є насправді (гібридний транскрипт експресується у епітелійних клітинах та ракових ПЗ, а маркери ПАФ – у фібробластах відповідно), або у

якомусь роді захисну функцію гібридного транскрипта проти ПАФ (при умові експресії в одному типі клітин). Це виглядає дивно, але певний біологічний сенс ці результати мають, що потребує подальших досліджень.

Наступні сім пухлино-асоційованих генів, для яких ми вивчали експресію в залежності від наявності гібридного транскрипта були гени: *TGFB1*, *IL1B*, *FOS*, *EFNA5*, *TAGLN*, *PLAU* та *EPDR1*. Тільки для трьох із них виявлено статистично значущі відмінності ВЕ між групами генів з урахуванням ГТ-статусу, це гени *EPDR1*, *FOS* та *PLAU* (рис. 3.61). За даними тесту Дана-Бонферроні для цих генів виявлено 5 значущих відмінностей ВЕ між парами груп. Але певна різниця ВЕ між *TMPRSS2-ERG*-позитивними та негативними пухлинами знайдено лише для двох генів: *EPDR1* та *FOS*. Так, для *EPDR1* виявлено значуще зниження ВЕ між *TMPRSS2-ERG*-негативними пухлинами та аденомами ($p= 0,0238$), тоді як для *TMPRSS2-ERG*-позитивних пухлин не відмічено значущих змін, хоча тенденція до зниження ВЕ в цій групі теж є. Другий ген, для якого є різниця між експресією у ГТ-позитивних та ГТ-негативних пухлинах – це *FOS*. Для цього гена характерно підвищення ВЕ у групах ГТ-негативних пухлин і УНТ у порівнянні з групою аденом ($p= 0,002$, $p= 0,0049$ відповідно). *PLAU* теж має значуще зниження ВЕ у порівнянні з аденомами, але воно знайдено для обох груп як ГТ-позитивних, так і ГТ-негативних пухлин. Тому у цьому випадку не можна говорити про диференційну експресію між групами.

Дослідження коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом ВЕ цих генів та ВЕ гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* не виявило жодної значущої кореляції між ВЕ досліджуваних генів, що може свідчити про різні шляхи та механізми розвитку пухлин ПЗ до яких відносяться пухлино-асоційовані гени та гібридний транскрипт *TMPRSS2-ERG*. Крім того, як показали співставлення експресії різними методами, низка цих генів експресується не в клітинах пухлин, а в стромі та клітинах імунної системи.

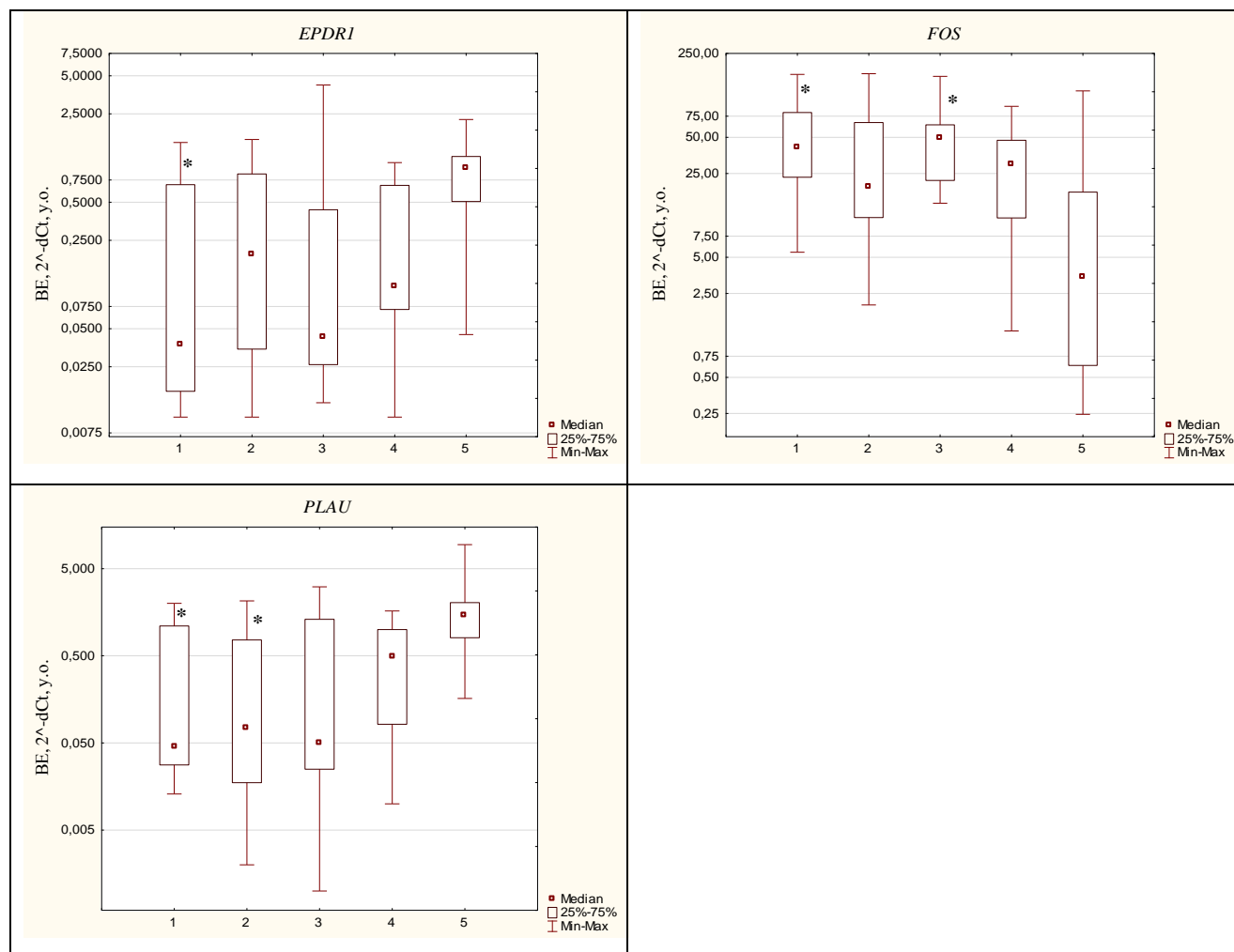


Рис. 3.61. Коробкові діаграми BE генів *FOS*, *PLAU* та *EPDR1* у ГТ-позитивних (+) та ГТ-негативних (-) групах зразків пухлин ПЗ: 1 – П-, 2- П+, 3 – Н-, 4 – Н+, 5 – А; * - значущі відмінності між групами у порівнянні з аденомами ($p < 0.05$) згідно тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

Згідно даних літератури останнім часом надається багато уваги дослідженням наявності гібридних транскриптів у пухлинах ПЗ. Наші дослідження свідчать про особливостей BE низки генів в залежності від наявності у пухлинах ГТ *TMPRSS2-ERG*. Але жодної відмінності BE генів між групами аденокарцином з різним ГТ статусом між собою ні для жодного гена нами не знайдено у зв'язку з високим рівнем дисперсії. Це може свідчити про наявність інших чинників, які паралельно впливають на рівні BE генів, окрім наявності ЗТ.

3.6.3. Експресія *PTEN* як молекулярна характеристика пухлин передміхурової залози. Ген *PTEN* є одним з найбільш вивчених у канцерогенезі ПЗ у зв'язку з важливими супресорними функціями у РІЗК-Акт онкогенному шляху [859].

Розглянемо більш детально особливості ВЕ гена *PTEN* у пухлинах ПЗ. Як вже біло відмічено, ВЕ гена *PTEN* була вивчена на 37 парах зразків аденокарцином передміхурової залози та УНТ за моделями $2^{-\Delta Ct}$ and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [720]. Але жодних статистично значущих відмінностей між групами ні за парним тестом Вілкоксона, ні за точним тестом Фішера не знайдено. Ці дані підтверджують висловлене нами раніше припущення, що УНТ не є дійсно нормальними і не становлять адекватний контроль в експерименті [730, 860].

На наступному етапі ми вивчили відносну експресію гена *PTEN* у трьох групах: аденомах, аденокарциномах та УНТ. Дані ВЕ представлені на рис. 3.62.

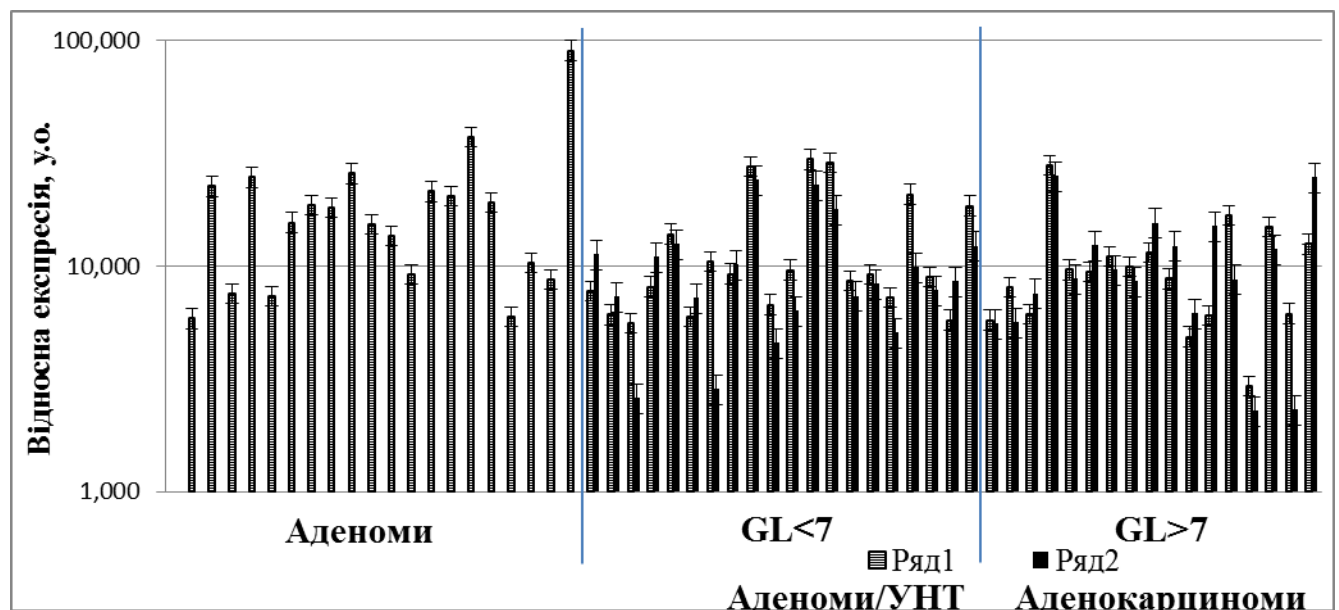


Рис. 3.62. Патерн відносної експресії гена *PTEN* у пухлинах ПЗ.

Якщо звернути увагу на парні зразки аденокарцином з їх УНТ, то у 29 з 37 пар ВЕ гена *PTEN* практично не відрізняється.

Для статистичного аналізу були використані наступні поділи на групи: 1) 3 групи аденокарциноми, УНТ, аденоми (П, Н, А); 2) за СГ (СГ<7, СГ=7, СГ>7);

3) за стадією захворювання (1-2, 3-4 стадії); 4) за наявністю ГТ *TMPRSS2-ERG* [695].

Тест Краскела-Уолліса з наступним Данн-Бонферроні тестом для множинних порівнянь показав наявність статистично значущих відмінностей тільки для першого типу групування. Так статистично значуще зниження ВЕ *PTEN* (рис. 3.63) спостерігається у групах аденокарцином ПЗ ($p=0,015$) та УНТ ($p=0,047$) у порівнянні з групою аденом передміхурової залози [861].

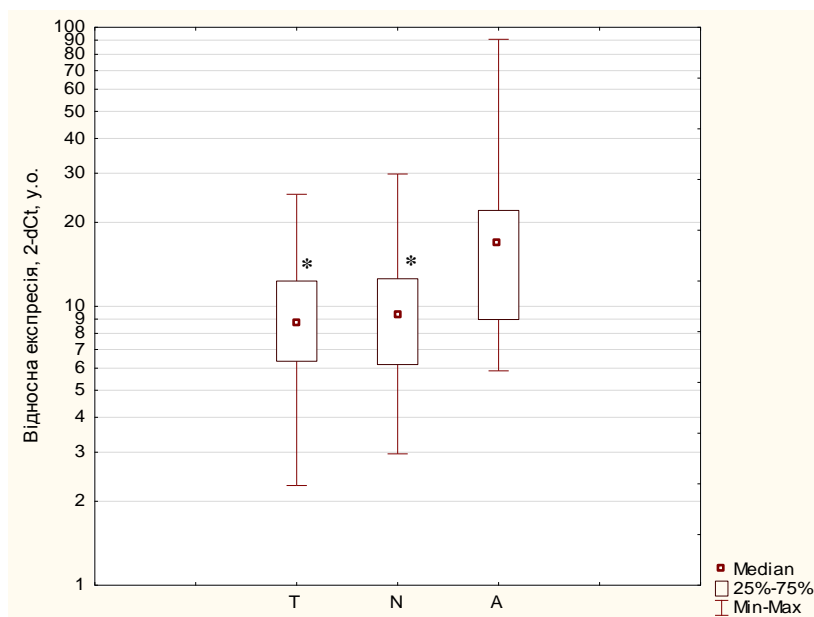


Рис. 3.63. Відносна експресія гена *PTEN* у групах аденокарцином (Т), УНТ (N) та аденом (А) передміхурової залози. * – $p<0,05$ у порівнянні з групою аденом (А) (Тест Данн-Бонферроні для множинних порівнянь)

Медіана у групі аденокарцином вдвічі менша ($M=8,76$), ніж у групі аденом передміхурової залози ($M=16,989$). УНТ ні в парних тестах, ні в групових не мають різниці ВЕ *PTEN* з аденокарциномами ПЗ.

Хоч не знайдено різниці у ВЕ гена *PTEN* між групами з наявністю та відсутністю гібридного транскрипта, відомо, що експресія генів *PTEN* та *ERG* статус є показниками для розділення (стратифікації) пацієнтів на різні групи щодо факторів виживання. Так, втрата експресії гена *PTEN* при відсутності *ERG* обумовлює негативний прогноз виживання пацієнтів після простатектомії [862].

Для вивчення впливу та зв'язків експресії гена *PTEN* на експресію генів інших генів та гістологічні характеристики пухлин передміхурової залози нами умовно розділено рівні ВЕ на 2 типи. Низьким рівнем (н) вважалась ВЕ гена *PTEN*, що більше, ніж у 2 рази менша за показник медіани групи аденом, тобто менша ніж 8,599. Високий рівень (в) ВЕ гена *PTEN* вважався вищим за цей показник. Згідно цьому поділу отримано 6 груп: П/н – 20 зразків, П/в – 17 зразків, Н/н – 18 зразків, Н/в – 19 зразків, А/н – 5 зразків, А/в - 15 зразків. Відсоток аденокарцином з низькою ВЕ гена *PTEN* складає 54 %, причому співвідношення зразків з в/н ВЕ між групами аденокарцином з різним СГ та стадіями не має відмінностей. Відсоток УНТ з низькою ВЕ гена *PTEN* складає – 48,6 %, а аденом – 25 %. Тобто, згідно отриманих даних можна припустити, що порушення експресії гена *PTEN* може відбуватись на ранніх етапах канцерогенезу і на етапах трансформації нормальних клітин в пухлинні. Подібні зміни експресії ми спостерігали для гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* [695].

Аналіз ВЕ 19 генів, пов'язаних з ЕМП [720] та 27 генів рецепторів гормонів, метаболічних ензимів [730], специфічних для передміхурової залози щодо впливу експресії гена *PTEN*, показав, що 9 з 46 досліджених генів мають статистично значущі відмінності між групами (табл. 3.59). Більшість значущих відмінностей ВЕ генів спостерігається між групами аденом та аденокарцином/УНТ. І тільки для 3 генів відмічено різниці між групами аденокарцином та УНТ (*ESR1*, *MMP2*, *VIM*). Серед генів зі знайденими змінами – 6 пов'язані з ЕМП, з яких 2 гени довгих некодувальних РНК (*PCAZ*, *HOTAIR*), які грають дуже важливу роль в прогресії раку передміхурової залози, а *PCAZ* є ще й онкогеном [863]. Крім того тільки для генів *PCAZ* та *HOTAIR* спостерігаються відмінності між медіанами у групах аденокарцином з високим та низьким рівнем експресії гена *PTEN* більш ніж у 40 та 3 рази відповідно, хоча тест для множинних порівнянь значущості відмінностей не підтвердив. У групах УНТ відмінності між низьким та високим рівнем експресії гена *PTEN* знайдено тільки для гена *ESR1* (більше, ніж 3 рази).

Таблиця 3.59.

Дані описової статистики ВЕ генів зі значущими відмінностями у групах
П, Н та А з різним рівнем експресії гена *PTEN*

Ген	Група	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	Пари груп, що мають відмінності $p < 0,05$ *
<i>ESR1</i>	П/Н	0,258	0,137	0,540	П/Н від А/В
	П/В	0,366	0,246	0,716	П/В від Н/Н
	Н/Н	0,105	0,045	0,173	
	Н/В	0,328	0,173	0,470	Н/В від А/В
	А/Н	0,061	0,057	0,118	П/В від А/Н
	А/В	0,066	0,046	0,109	П/В від А/В
<i>GCR (AG isof)</i>	П/Н	2,531	2,266	3,080	
	П/В	2,528	1,985	3,974	
	Н/Н	2,163	1,826	2,817	Н/Н від Н/В
	Н/В	3,219	2,648	4,096	
	А/Н	2,688	2,537	3,190	
	А/В	2,615	2,367	3,761	
<i>KRT18</i>	П/Н	21,480	16,231	36,607	П/Н від А/Н
	П/В	21,912	17,656	27,333	П/В від А/Н
	Н/Н	18,025	10,620	23,940	
	Н/В	15,571	9,817	16,505	
	А/Н	3,416	3,342	12,197	
	А/В	13,593	9,153	20,603	
<i>MMP2</i>	П/Н	10,168	5,986	14,323	
	П/В	15,833	11,878	22,131	П/В від Н/Н
	Н/Н	7,308	3,660	10,423	
	Н/В	12,796	9,321	15,850	
	А/Н	14,635	6,879	16,889	
	А/В	10,391	8,062	13,059	
<i>MMP9</i>	П/Н	0,822	0,201	2,233	
	П/В	1,122	0,558	2,645	П/В від А/В
	Н/Н	0,437	0,161	0,924	
	Н/В	0,946	0,263	1,891	Н/В від А/В
	А/Н	0,440	0,166	0,549	
	А/В	0,194	0,121	0,340	
<i>SRD5A2</i>	П/Н	0,418	0,182	0,767	П/Н від А/В
	П/В	0,626	0,466	0,827	
	Н/Н	0,537	0,315	0,846	
	Н/В	0,661	0,434	1,038	
	А/Н	2,022	0,573	2,279	
	А/В	0,994	0,669	1,523	

Продовж. табл. 3.59.

Ген	Група	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	Пари груп, що мають відмінності $p < 0,05$ *
<i>VIM</i>	П/Н	9,406	5,749	14,223	
	П/В	13,299	8,620	16,278	П/В від Н/Н
	Н/Н	7,465	4,773	11,214	Н/Н від А/В
	Н/В	10,266	7,832	12,199	
	А/Н	13,606	11,476	15,272	
	А/В	12,289	10,043	15,675	
<i>PCSA3</i>	П/Н	4,708	0,254	24,615	
	П/В	0,114	0,028	1,656	
	Н/Н	0,320	0,059	3,548	
	Н/В	0,289	0,088	1,331	
	А/Н	0,020	0,001	0,058	П/Н від А/Н
	А/В	0,048	0,030	0,136	П/Н від А/В
<i>HOTAIR</i>	П/Н	0,013	0,002	0,041	П/Н від А/В
	П/В	0,004	0,000	0,025	П/В від А/В
	Н/Н	0,003	0,001	0,007	
	Н/В	0,005	0,001	0,011	Н/В від А/В
	А/Н	0,002	0,001	0,003	
	А/В	0,000	0,000	0,000	

Примітка. * – тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

Відмінності між медіанами більше, ніж у 2 рази також спостерігаються у групах аденом з низькою та високою ВЕ гена *PTEN* для генів *KRT18*, *MMP9* та *SRD5A2* [861]. Тобто вплив втрати експресії гена *PTEN* може відбуватись вже на стадії доброякісної гіперплазії, що потребує подальших досліджень.

Вивчення кореляції за Спірменом між експресією гена *PTEN* у аденокарциномах передміхурової залози та клініко-патологічними характеристиками, наведеними у табл. 3.60 показало відсутність будь-яких значущих кореляцій. Тоді як 4 з 6 вказаних гістологічних показників мають значущі негативні кореляції з ВЕ *PTEN*. Причому самий високий негативний коефіцієнт кореляції $r^s = -0,450$ притаманний характеристиці «запалення».

Проведення кореляційного аналізу між експресією *PTEN* та 46 генами ЕМП та простат-специфічних виявило лише 7 значущих кореляцій між цими показниками (табл. 3.60). Така невелика кількість кореляцій між генами та

Таблиця 3.60.

Значущі коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) для BE гена*PTEN* аденокарцином передміхурової залози

Ознака/ген	<i>PTEN</i> BE
Слизиста карцинома	-0,348
Крибозна карцинома	-0,353
Фіброзно-м'язова гіперплазія	-0,370
Запалення	-0,450
<i>ESR2</i>	0,459
<i>GCR (AG isof)</i>	0,466
<i>MMP2</i>	0,497
<i>PSA</i>	-0,352
<i>SRD5A2</i>	0,358
<i>PCA3</i>	-0,428
<i>SCHLAP1</i>	-0,353

відсутність кореляції з клініко-патологічними характеристиками може свідчити з однієї сторони про відсутність впливу змін експресії гена *PTEN* на дані процеси розвитку пухлин передміхурової залози, зокрема ЕМП та розвиток андрогенної резистентності. З іншої сторони це може бути проявом дуже раннього впливу на ще не ракові епітелійні клітини, що може детермінувати шляхи розвитку пухлин, про це свідчать кореляції з крибозною та слизистою карциномою (досить рідкими типами раку передміхурової залози) та дані літератури про вплив втрати BE *PTEN* на процеси канцерогенезу [864-866].

Вивчення впливу експресії гена *PTEN* на можливі зміни BE у пухлинах ПЗ генів ліпідного обміну не виявило значущих та специфічних відмінностей BE у цій групі генів. Встановлення коефіцієнтів рангової кореляції за Спірменом показало наявність однієї позитивної значущої кореляції між BE *CPT1C* та *PTEN* ($r^s = 0,575$, $p < 0,01$).

Дослідження впливу BE гена *PTEN*, як можливої молекулярної характеристики проведено і для 23 генів груп ПАФ, ПАМ та ІАГ. У табл. 3.61 наведені гени зі значущими відмінностями BE у групах з різним рівнем експресії *PTEN*. Згідно тесту Дана-Бонферроні виявлено 17 пар груп зразків

Таблиця 3.61.

Відмінності ВЕ генів ПАФ, ПАМ та ІАГ між парами ПНА груп з різними рівнями ВЕ гена *PTEN*

ПНА/ <i>PTEN</i> ВЕ (в/н)			ПНА/ <i>PTEN</i> ВЕ (в/н)		
Гени	Групи зразків	<i>p</i> -рівні*	Гени	Групи зразків	<i>p</i> -рівні*
<i>THY1</i>	П в/А н	0,0431	<i>CTGF</i>	П н/А в	0,0294
<i>CXCL12</i>	П н/А в	0,0000		П в/А в	0,0028
	П в/А в	0,0406		Н в/А в	0,0340
	Н н/А в	0,0000		П в/Н н	0,0189
	П н/Н в	0,0358	<i>FAP</i>	П в/А н	0,0374
<i>CXCL14</i>	П н/А в	0,0000	<i>CTLA4</i>	Н н/А в	0,0437
	П в/А в	0,0023	<i>CCR4</i>	П н/А в	0,0037
	Н н/А в	0,0303	<i>IL1R1</i>	Н н/А в	0,0240
	П н/А н	0,0123			

Примітки: 1. * - за тестом Дана-Бонфероні для множинних порівнянь з FDR=0,2; 2. в/н – групи зразків з високою (в) або низькою (н) ВЕ *PTEN*

для 8 генів серед ПНА груп з високою (в) та низькою (н) рівнем ВЕ гена *PTEN*.

Більшість відмінностей ВЕ (10 пар) відмічено між групами аденокарцином та аденом з високим або низьким рівнем ВЕ гена *PTEN* у 6 з 8 генів зі значущими різницями ВЕ: *THY1*, *CXCL12*, *CXCL14*, *CTGF*, *FAP*, *CCR4*. 5 пар відмінностей ВЕ виявлено між УНТ та аденомами з високим або низьким рівнем ВЕ гена *PTEN* для 5 генів: *CXCL12*, *CXCL14*, *CTGF*, *CTLA4*, *IL1R1*. Лише 2 пари відмінностей ВЕ спостерігається між аденокарциномами та УНТ (Н) з високим або низьким рівнем ВЕ гена *PTEN* для 2 генів: *CXCL12*, *CTGF*. Жодної значущої відмінності не знайдено між рівнями ВЕ генів в групах аденокарцином з високим та низьким рівнем ВЕ гена *PTEN* через високі рівні дисперсії даних та вплив, як ми припускаємо, інших факторів.

Щодо кореляції між рівнями ВЕ та стромальних генів, виявлено лише 4 значущих кореляцій з 23 (табл. 3.62 а-в), причому всі вони позитивні і відносяться до групи ПАФ.

Таблиця 3.62.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) ВЕ генів ПАФ, ПАМ, ІАГ та ВЕ гена *PTEN* у аденокарциномах ПЗ

ПАФ

Ген/ транскрипт	<i>ACTA2</i>	<i>CTGF</i>	<i>CXCL12</i>	<i>CXCL14</i>	<i>HIF1A</i>	<i>FAP</i>	<i>S100A4</i>	<i>THY1</i>
<i>PTEN</i> ВЕ	0,447	0,285	0,529	0,002	0,146	0,439	0,431	0,205

ПАМ

Ген/ транскрипт	<i>CD68</i>	<i>CD163</i>	<i>CCL17</i>	<i>CCL22</i>	<i>CCR4</i>	<i>NOS2A</i>
<i>PTEN</i> ВЕ	0,234	0,290	-0,007	0,160	0,180	0,183

ІАГ

Ген/ транскрипт	<i>CIAS</i>	<i>CTLA4</i>	<i>HLA-G</i>	<i>IL1R1</i>	<i>IL1RL1</i>	<i>IL2RA</i>	<i>IRF1</i>	<i>KLRK</i>	<i>MSMB</i>
<i>PTEN</i> ВЕ	0,103	0,024	0,192	0,133	0,109	0,026	0,096	0,050	-0,126

Примітки: $p < 0.05$ – червоний, $p < 0.01$ – червоний курсив, $p < 0.001$ – червоний жирний

3.6.4. Виявлення та аналіз молекулярних підтипів аденокарцином за показниками відносної експресії ЕМП-пов'язаних генів й простато-специфічних генів та генів, асоційованих з елементами стромы пухлин передміхурової залози. На проведення цього дослідження нас наштовхнули результати вивчення рівнів ВЕ генів, які мають великий рівень дисперсії особливо у групах аденокарцином, навіть однієї стадії та одного СГ. З однієї сторони це може бути результатом значної гетерогенності зразків пухлин, як відомо з даних літератури [147, 148, 203, 599, 600, 674], з іншого боку, як ми припускаємо, це може результатом перебування в одній групі зразків з різними молекулярними підтипами. Наше припущення також підтверджується даними літератури [850]. Тому ми вирішили за допомогою методів кластеризації спробувати знайти можливі підтипи аденокарцином ПЗ на основі результатів встановлення рівнів ВЕ досліджуваних груп генів у зразках аденокарцином ПЗ.

Для цього спочатку ми взяли для аналізу лише 19 ЕМП-пов'язаних генів. Проведення кластеризації за методом К-центрів з використання Евклідової метрики ВЕ досліджених генів у аденокарциномах ПЗ для пошуку характерних профілів ВЕ та розділення на можливі молекулярні підтипи раку ПЗ виявило від 2 до 4 кластерів, на які розділяються зразки аденокарцином згідно профілів їх експресії. Але кращі показники кластеризації (відстані між кластерами) отримано для двох кластерів. Профілі нормалізованої ВЕ з отриманими двома молекулярними підтипами аденокарцином ПЗ наведено на рис. 3.64.

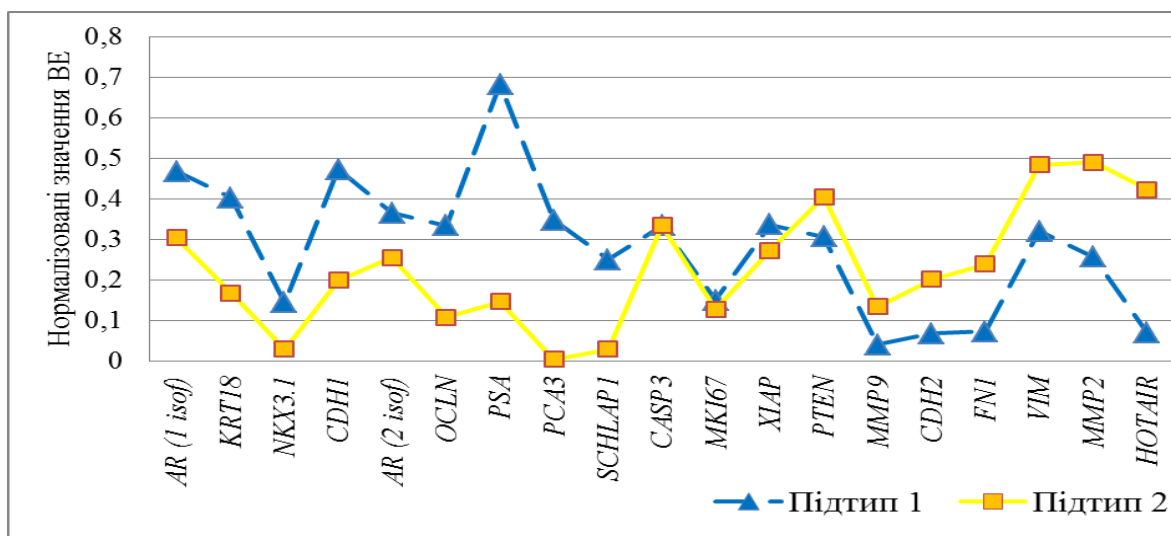


Рис. 3.64. Профілі нормалізованої ВЕ досліджуваних генів (ЕМП-пов'язаних) у двох молекулярних підтипах аденокарцином ПЗ за даними кластеризації методом К-центрів

Середні значення ВЕ генів у обох підтипах (кластерах) аденокарцином та значущі відмінності між кластерами з результатами тесту Краскела-Уолліса з $FDR=0,2$ представлено у табл. 3.63. Слід відмітити, що дані кластеризації добре узгоджуються з даними тесту рангової кореляції за Спірменом.

Підтип 1 та 2 у складі мають аденокарциноми різних стадій й СГ, та не мають відмінностей за цими показниками. Отже ми можемо припустити, що у даному випадку мова йде саме про молекулярні підтипи пухлин ПЗ. Підтип 1 складається з 20 зразків аденокарцином (54%), а підтип 2 має 17 зразків аденокарцином (46%). Тобто зразки пухлин діляться між цими кластерами

Таблиця 3.63.

**Середні значення BE генів у підтипах аденокарцином з результатами тесту
Краскела-Уолліса з FDR=0,2**

Підтип	Стадія	Кількість зразків	%	<i>AR 1 isof</i>	<i>AR 2 isof</i>	<i>CASP3</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDH2</i>	<i>FN1</i>	<i>KRT18</i>	<i>MKI67</i>
1	2	20	54,054	1,788	0,025	0,320	4,800	0,093	4,301	34,891	0,196
2	2	17	45,946	1,308	0,018	0,317	2,047	0,275	10,988	15,627	0,169
p<0,05 *							*	*	*	*	

Підтип	<i>MMP2</i>	<i>MMP9</i>	<i>NKX3.1</i>	<i>OCN</i>	<i>PSA</i>	<i>PTEN</i>	<i>VIM</i>	<i>XIAP</i>	<i>PCAZ</i>	<i>HOTAIR</i>	<i>SCHLAP1</i>
1	9,985	1,133	0,968	1,267	545,549	9,319	10,396	0,386	19,538	0,005	0,588
2	17,380	3,714	0,218	0,411	122,639	11,594	13,690	0,328	0,241	0,033	0,069
p<0,05 *	*	*	*	*	*				*	*	*

Примітка. * - Статистично значущі відмінності між групами (p<0,05) за тестом Краскела-Уолліса з FDR=0,2

майже навпіл. Всі гени в двох підтипах можна віднести до трьох груп залежно від рівнів їх BE: 1) високий рівень BE в підтипі 1 (у порівнянні з 2-м) (ці гени - потенційні маркери цього підтипу); 2) високий рівень BE в підтипі 2 (ці гени - потенційні маркери підтипу 2); 3) рівні BE без змін в обох підтипах (приблизно однакові BE).

За даними тесту Краскела-Уолліса 12 генів мають значущі відмінності BE між двома підтипами. У першому підтипі 7 генів мають підвищення BE: *CDH1*, *KRT18*, *NKX3.1*, *OCN*, *PSA*, *PCAZ*, *SCHLAP1*. У другому - 5 генів зі значущим підвищенням BE: *CDH2*, *FN1*, *MMP2*, *MMP9*, *HOTAIR*. Експресія *AR* хоч і підвищена у 1 підтипі, але ці зміни не значущі.

Гени підтипу 1, які високо експресуються та являються його ознаками-маркерами, є епітелійними маркерами (*CDH1*, *KRT18*, *OCN*) та маркерами клітин передміхурової залози (*AR* (1 isof), *NKX3-1*, *PSA*). Висока експресія цих генів характерна для люмінального підтипу пухлин [867, 868].

Крім того, у підтипі 1 виявлена висока ВЕ двох довгих некодувальних РНК (*PCAZ* і *SCHLAP1*). *PCAZ* - дуже високо специфічна lncRNA для клітин раку передміхурової залози. [869]. Поява експресії *SCHLAP1* асоціюється з метастатичним прогресуванням при раку ПЗ [870]. Підвищена ВЕ *AR 2 isof* в підтипі 1, що є тканинспецифічним варіантом, названим *AR45* та не є характерним для нормальних тканин ПЗ, відіграє дуже важливу роль у модуляції функції *AR* у пухлинах ПЗ, особливо при наявності андрогенів надниркових залоз [871].

Протилежна ситуація спостерігається з рівнями ВЕ в підтипі 2. Низька експресія маркерів епітелійних клітин та висока експресія мезенхімних маркерів (*CDH2*, *FN1*, *VIM*) є характерним для базального підтипу раку ПЗ [868, 872]. З іншого боку, ці зміни експресії характерні для ракових стовбурових клітин [872]. Виявлені значущі високі рівні ВЕ металопротеїназ *MMP2* й *MMP9* та lncRNA *HOTAIR* є показниками активізації процесів метастазування [718]. Крім того, встановлено, що *HOTAIR* є специфічною lncRNA для субпопуляції ракових стовбурових клітин шлунка [871].

Ми вважаємо, що зразки раку передміхурової залози з різних підтипів можуть бути суб'єктами різних онкогенних шляхів, канцерогенних механізмів і, як наслідок, вони можуть мати різну чутливість до препаратів, прогноз та перебіг захворювання [868].

За даними літератури, дослідники намагались встановити молекулярні підтипи раку передміхурової залози. Так, за результатами TCGA проекту та інших досліджень зразки раку ПЗ були стратифіковано на 3-7 молекулярних підтипів відповідно до транскриптомних змін [868, 872] або виходячи з генетичних, епігенетичних та транскриптомних змін сотень генів [873]. Тому, щоб запропонувати молекулярне профілювання підтипів раку ПЗ, ми дослідили та охарактеризували зміни рівнів ВЕ більшої кількості генів, асоційованих з раком ПЗ згідно їх функцій у канцерогенезі.

Беручи до уваги отримані результати кластеризації, ми розширили перелік генів для пошуку специфічних профілів експресії та молекулярних

підтипів раку ПЗ. Для цього ми провели кластеризацію за методом К-центрів ВЕ 33 транскриптів груп ЕМП-пов'язаних та генів, асоційованих з раком ПЗ у групі аденокарцином ПЗ та експресію гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* [730, 737]. Найкращі результати розділення між кластерами ми отримали для трьох кластерів, які потенційно можуть бути трьома молекулярними підтипами раку ПЗ (рис. 3.65).

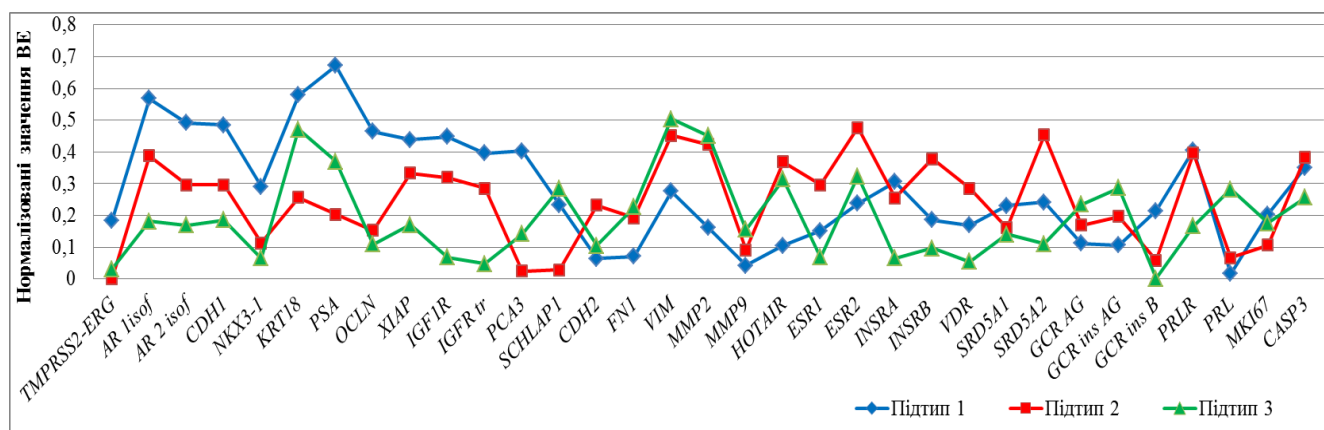


Рис. 3.65. Профілі ВЕ досліджуваних генів у трьох молекулярних підтипах аденокарцином ПЗ за даними кластеризації за методом К-центрів

Виявлені 3 кластери (підтипи) зі специфічними рівнями ВЕ, які включають 33 з 37 зразків аденокарцином, що становить 89%. Ці підтипи мають значущі відмінності ВЕ у 21 з 33 транскриптів за результатами тесту Дана-Бонферроні для множинних порівнянь (табл. 3.64). Найбільша відстань відзначається між 1 та 3 кластером, тобто ним притаманні найбільші відмінності між рівнями ВЕ досліджуваних генів. Різниці у СГ не знайдено.

Кластер/підтип 1 містить 12 зразків аденокарцином, з яких усі є ГТ-позитивними, тобто з виявленим ГТ *TMPRSS2-ERG*. Крім того, для цього кластера є характерними підвищення ВЕ генів *AR*, епітелійних маркерів (*CDH1*, *NKX3-1*, *OCLN*) та маркерів раку ПЗ (*PSA*, *PCA3*, *KRT18*, *SCHLAP1*). Широко відомо, що підвищення експресії епітелійних та люмінальних маркерів зазвичай спостерігається на фоні низької експресії мезенхімних маркерів, що і відмічено для підтипу 1. Однак, нами показано одночасна висока експресія ГТ, *PCA3* та *NKX3-1* в одному підтипі. Перші два є проявом активації онкогенних шляхів, а

Таблиця 3.64.

Показники ВЕ трьох підтипів аденокарцином зі статистично значущими відмінностями між ними за тестом Дана-Бонферроні

№ кластера	Кількість зразків	%	ГТ-статус	Стадія	СГ	T/ERG	AR 1 isof	AR 2 isof	CDH1	CDH2	KRT18	NKX3-1	PCSA3
1	12	36,4	1	2	7	0,94	2,10	0,03	4,92	0,09	31,78	0,82	22,61
2	13	39,4	0	2	6	0,00	1,57	0,02	3,03	0,32	15,11	0,34	0,22
3	8	24,2	0	3	9	0,01	0,97	0,01	1,92	0,14	26,15	0,21	7,98
p-рівень < 0,05				*, **	*, **	*, ***	***	***	***	**	*	***	*

№ кластера	PSA	FNI	VIM	OCLN	MMP2	MMP9	HOTAIR	SCHLAP1	MKI67	CASP3	XIAP	ESR1	ESR2
1	537,05	4,57	9,50	1,76	8,22	1,18	0,01	0,55	0,25	0,35	0,48	0,44	0,03
2	166,95	9,42	13,04	0,51	16,43	2,52	0,03	0,01	0,14	0,38	0,38	0,81	0,05
3	299,15	10,77	14,10	0,42	16,15	4,28	0,02	0,67	0,23	0,28	0,23	0,22	0,03
p-рівень < 0,05	*			*, ***	*			*, **				**	

№ кластера	GCR AG	GCR B	GCR ins AG	GCR ins B	INSR A	INSR B	IGF1R	IGFR tr	PRLR	PRL	VDR	SRD5A1	SRD5A2
1	2,49	0,00	2,41	8,45	0,48	0,35	4,32	4,33	0,12	0,00	0,16	0,10	0,46
2	3,26	4,73	3,65	2,50	0,46	0,60	3,21	3,26	0,12	0,00	0,23	0,07	0,82
3	4,15	0,00	4,88	0,85	0,15	0,23	1,02	0,94	0,05	0,01	0,09	0,07	0,25
p-рівень < 0,05					***, ***	*, **	***, ***	***, ***	***	***	***, ***		**

Примітки: 1. * - значуща різниця ВЕ між 1 та 2 кластерами; 2. ** - значуща різниця ВЕ між 2 та 3 кластерами; 3. *** - значуща різниця ВЕ між 1 та 3 кластерами

відсутність інгібування специфічного для ПЗ гена-супресора росту пухлин *NKX3-1* може бути цікавою особливістю, що свідчить про те, що інгібування експресії цього супресора не є необхідним елементом при активації цих двох онкогенних шляхів – ERG та *PCSA3* [646, 696, 717, 863], враховуючи відношення *NKX3-1* до іншого сигнального шляху [659, 703]. З іншого боку, ймовірно, онкогенний шлях *PCSA3* [869] працює паралельно з активованим ERG [701].

Отже, кластер 1 можна охарактеризувати як ГТ-позитивні андроген-чутливі аденокарциноми люмінального підтипу 1, які мають крім високої чутливості до андрогенів, чутливість до пролактину, інсулінового фактору росту 1, інсуліну, що посилюють онкогенні сигнали, та активованих онкогенних шляхів ERG та PCA3 [696, 717].

Кластер/підтип 3 містить пухлини з найвищим СГ та стадіями. Тобто у його склад входять найбільш агресивні пухлини ПЗ. Це підтверджується даними BE генів. Так, наприклад, відмічено, що зразки аденокарцином мають найнижчу експресію *AR*, що є ознакою андроген-резистентних пухлин, як і низька BE епітелійних маркерів (*CDH1*, *OCLN*, *NKX3-1*), ферментів стероїдогенезу (*SRD5A2*), та рецепторів інсуліну та інсулінового фактору росту (*INSRA*, *INSRB*, *IGF1R*). Також про агресивний характер пухлин у цій групі свідчить підвищена BE гена *PRL*, довгих некодувальних РНК *SCHLAP1* та *HOTAIR*, а також підвищення експресії генів мезенхімних маркерів *VIM*, *FN1*, *MMP2*. До того ж цей підтип має лише 2-і ГТ-позитивні аденокарциноми з 8-и.

Ми вважаємо, що кластер 3 є іншим підтипом люмінального раку ПЗ, який є переважно ГТ-негативним з андроген-незалежними та кастрат-резистентними характеристиками [863] (ГТ-негативний андроген незалежний люмінальний підтип 2). Описані молекулярні характеристики свідчать про ймовірну резистентність до Ензалутаміду [874] – висока експресія *HOTAIR*, та можливу стимуляцію процесів канцерогенезу через *PRL/STAT5* сигнальний шлях завдяки експресії *PRL* цими пухлинами, що посилює андрогенну резистентність [728].

Профілі експресії зразків, що входять до підтипу 2 мають такі особливості: низька епітелійних та люмінальних маркерів (*KRT18*, *PCA3*, *PSA*) мають найнижчу експресію, тоді як мезенхімні маркери *CDH2*, *MMP2*, *FN1*, *VIM* є високо-експресованими. Описані характеристики є притаманними для стовбуроподібного (базального) підтипу раку ПЗ [762, 867, 872]. Крім того високі рівні BE *ESR1*, *SRD5A2*, *INSRB*, *PRLR* and днсРНК *HOTAIR* надають цьому кластеру посилені карциногенні властивості.

Далі ми вирішили ще розширити кількість генів/транскриптів для кластерного аналізу. Але, додавання до набору ЕМП-пов'язаних та генів, асоційованих з раком ПЗ інших генів маркерів стромальних елементів не призводило до покращення результатів та більш значущому розділенню кластерів. Можна припустити, що ці параметри потребують окремого вивчення та є, у певному сенсі, різними показниками. Одні характеризують стан клітин пухлин, а інші – стан мікрооточення. Хоча багато генів з різних груп за результатами наших досліджень мають значущі кореляції ВЕ [875].

Крім стану клітин пухлин важливе значення для ефективної діагностики та терапії має пухлинне мікрооточення. Як відомо багато елементів, такі як пухлино-асоційовані фібробласти, пухлино-асоційовані макрофаги, пухлино-інфільтруючі лімфоцити супроводжують і підтримують розвиток й метастазування пухлин, а також знижують ефективність протипухлинної терапії. Тому встановлення особливостей пухлинного мікрооточення є важливим завданням для діагностики, прогнозу і підбору ефективної терапії.

Проведення кластерного аналізу за методом К-центрів окремо для 8 генів групи ПАФ та урахуванням стадій захворювання виявило 3 кластери зразків аденокарцином ПЗ з різними профілями ВЕ досліджуваних генів (рис. 3.66).

Кластеризовано 100% зразків аденокарцином. Показники середніх значень ВЕ трьох кластерів генів ПАФ аденокарцином зі статистично значущими відмінностями між ними за тестом Дана-Бонферроні для

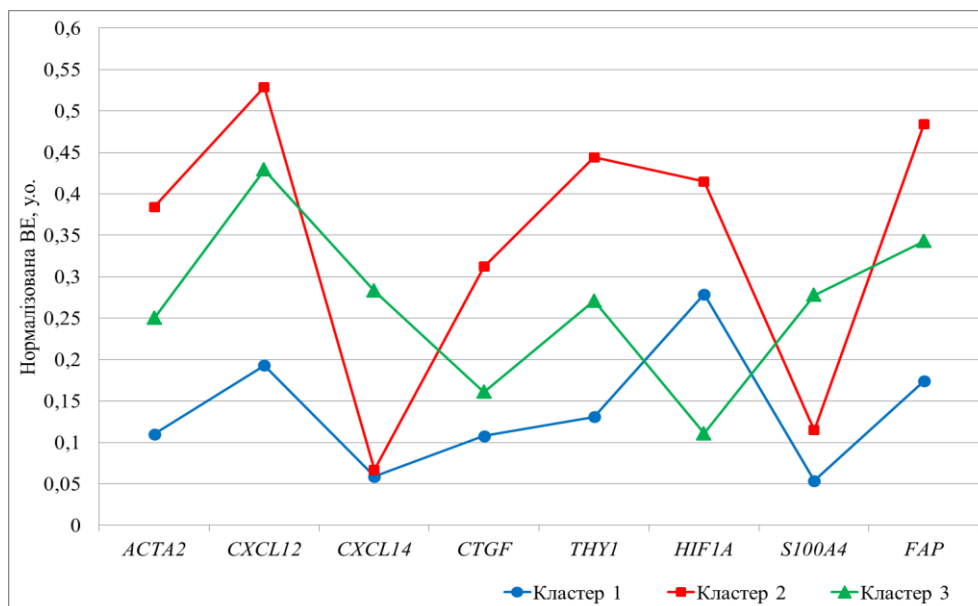


Рис. 3.66. Профілі ВЕ генів ПАФ групи у трьох кластерах аденокарцином ПЗ за даними кластеризації за методом К-центрів

множинних порівнянь наведено у табл. 3.65. Статистичний аналіз виявив значущі відміни ВЕ для 7 з 8 генів ПАФ між різними кластерами. Крім того ці профілі ВЕ пов'язані з КПХ – стадією захворювання. Так, у 1 та 2 кластерах знаходяться зразки переважно 1-2 стадії, тоді як у 3 кластері – більш агресивні пухлини 3-4 стадії. Причому це статистично значущі різниці між кластерами з $p=0,0002$ для обох відмінностей стадій між 1 й 3 та 2 й 3 кластерами.

Таблиця 3.65.

Показники ВЕ кластерів генів ПАФ зі статистично значущими відмінностями за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

№ кластера	Стадія	Кількість зразків	% зразків	ACTA2	CXCL12	CXCL14	CTGF	THY1	HIF1A	S100A4	FAP
1	2	16	43,2	64,060	0,088	3,911	9,718	1,227	1,923	15,292	0,123
2	2	12	32,4	171,187	0,190	3,968	22,470	2,906	2,517	31,986	0,320
3	3	9	24,3	118,821	0,160	18,113	13,049	1,971	1,147	73,738	0,230
$p < 0,05$	*, **			*	*		*	*	*, **	*, **	*

Примітки: 1. * - значуща різниця ВЕ між 1 та 2 кластерами; 2. ** - значуща різниця ВЕ між 1 й 3 та 2 й 3 кластерами

Отже, виявлено 2 різних молекулярних підтипи ВЕ генів ПАФ пухлин ПЗ з приблизно однаковою стадією захворювання зі значущими відмінностями ВЕ між п'ятьма генами групи ПАФ: *ACTA2* ($p < 0,0001$), *CXCL12* ($p = 0,0007$), *CTGF* ($p = 0,0096$), *THY1* ($p < 0,0001$), *FAP* ($p = 0,0010$). Показники ВЕ цих генів для кластера 3, який включає пухлини більш агресивні, має проміжні значення ВЕ між кластером 1 й 2 для цих генів.

Можна припустити, що ці два молекулярні профілі (кластери 1 та 2) характеризують різні популяції пухлино-асоційованих фібробластів або їх різні кількісні показники у стромі пухлин. Інша ситуація спостерігається для значень ВЕ генів *HIF1A* та *S100A4*. Ці гени мають значущі відмінності між 3 та разом 1 й 2 кластерами, причому *HIF1A* має мінімальне значення ВЕ ($p = 0,0335$; $p = 0,0011$ відповідно), а *S100A4* ($p = 0,0333$; $p = 0,0145$ відповідно) – максимальне у кластері 3. Така ж тенденція змін ВЕ у кластерах, як має *S100A4*, спостерігається й для ВЕ *CXCL14*, але статистичних відмінностей за даними тесту Дана-Бонферроні не виявлено. Тобто, гени *HIF1A*, *S100A4* (і потенційно *CXCL14*) можна вважати своєрідними ПАФ маркерами прогресії раку ПЗ.

Слід відмітити, що кластеризація генів ПАФ без урахування стадій давала розподіл зразків аденокарцином лише на 2 кластери, з меншими значеннями відстаней, ніж при кластеризації зі стадіями та значущими відмінностями ВЕ між кластерами лише для чотирьох генів. З цих результатів можна зробити висновок, що стадії у даному випадку є значущим параметром для розділення аденокарцином на підтипи за ознаками ВЕ ПАФ генів.

Наступна група генів маркерів стромальних елементів, для якої проведено кластеризацію ВЕ у аденокарциномах, це макрофаги та ПАМ. За результатом кластерного аналізу за методом К-центрів для 6 генів групи ПАМ та урахуванням стадій захворювання виявлено 3 кластери зразків аденокарцином ПЗ з різними профілями ВЕ досліджуваних генів (рис. 3.67). Кластеризовано 100% зразків аденокарцином. Показники середніх значень ВЕ кластерів генів ПАМ аденокарцином зі статистично значущими відмінностями між ними за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь наведено у

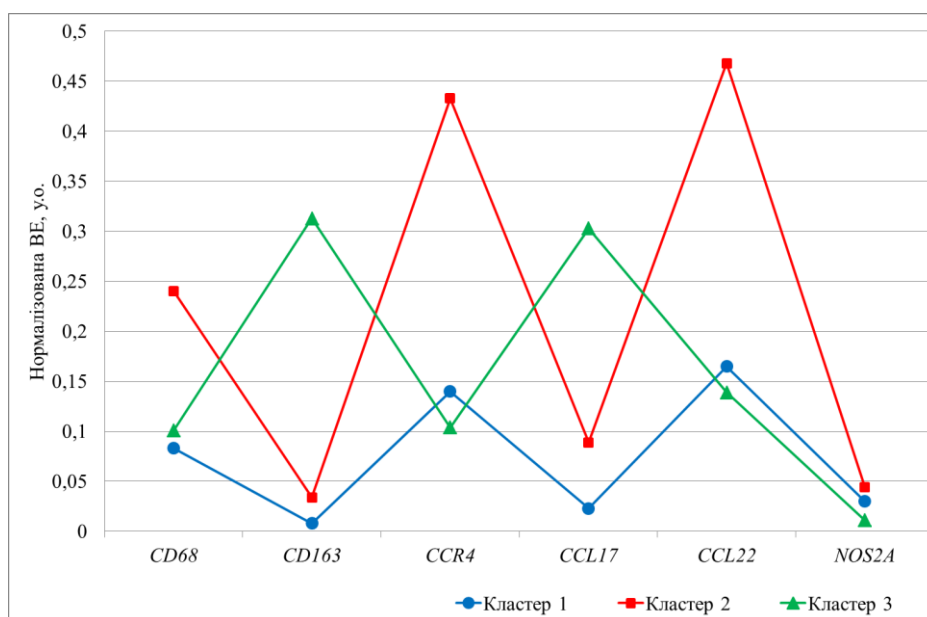


Рис. 3.67. Профілі VE генів ПАМ групи у трьох кластерах аденокарцином ПЗ за даними кластеризації за методом К-центрів

табл. 3.66. Статистичний аналіз виявив значущі відмінності VE для усіх 6 генів між різними кластерами без винятків, як і значущі різниці показників стадій між кластерами. Як і гени ПАФ групи, ПАМ гени можна умовно розділити на 2 типи: гени, що характеризують, як ми вважаємо, різні підтипи макрофагів у одній стадії захворювання, тобто мають значущо різні профілі VE у кластерах

Таблиця 3.66.

Показники VE кластерів генів ПАМ зі статистично значущими відмінностями за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

№ кластера	Кількість зразків	% зразків	Стадія	CD68	CD163	CCR4	CCL17	CCL22	NOS2A
1	15	40,5	2	1,800	1,861	0,093	0,007	0,108	0,008
2	2	5,4	2	14,070	10,457	0,640	0,034	0,518	0,149
3	9	24,3	3	2,004	45,181	0,070	0,072	0,092	0,003
4	11	29,7	2	4,589	5,534	0,284	0,022	0,303	0,011
p<0,05			**	*, **	*, ***	*, **	***	*, **	**

Примітки: 1. * - значуща різниця VE між 1 та 2 кластерами; 2. ** - значуща різниця VE між 2 та 3 кластерами; 3. *** - значуща різниця VE між 1 та 3 кластерами

1, 2 – до яких входять аденокарциноми 1-2 стадії: *CD68*, *CCR4*, *CCL22*. Інша група генів може характеризувати відмінності між аденокарциномами з різними стадіями захворювання. Тобто у кластерах, що мають аденокарциноми 1-2 стадії ВЕ цих генів не відрізняється (кластер 1 та 2), але вони мають відмінні рівні ВЕ від кластеру аденокарцином з 3-4 стадією (кластер 3): *CD163*, *CCL17*, *NOS2A*.

Наступна група генів маркерів, для якої проведено кластеризацію ВЕ у аденокарциномах, це ІАГ, до якої входило 9 генів (рис. 3.68). За результатом кластерного аналізу за методом К-центрів для 9 генів ІАГ та урахуванням

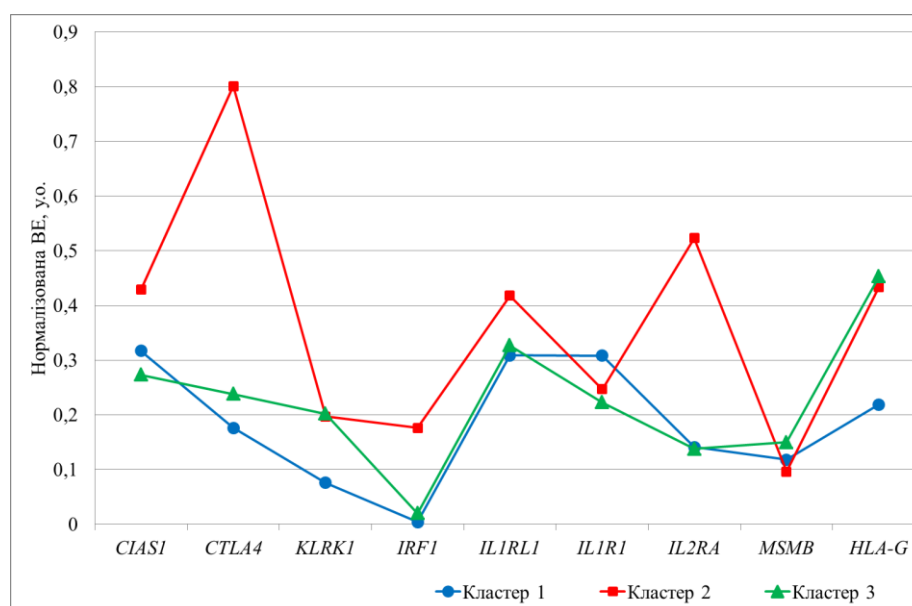


Рис. 3.68. Профілі ВЕ генів ІАГ групи у трьох кластерах аденокарцином ПЗ за даними кластеризації методом К-центрів.

стадій захворювання виявлено 3 кластери зразків аденокарцином ПЗ з різними профілями ВЕ досліджуваних генів. Кластеризовано, як і для попередніх груп генів стромальних маркерів, 100% зразків аденокарцином.

Показники середніх значень ВЕ генів ІАГ групи у трьох кластерах аденокарцином зі статистично значущими відмінностями між ними за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь наведено у табл. 3.67. Статистичний аналіз виявив значущі відмінності ВЕ між кластерами лише для 4 генів: *CTLA4*, *IRF1*, *IL2RA*, *HLA-G*.

Крім того два кластери 1 та 2 включають переважно аденокарциноми 1-2 стадії, тоді як кластер 3 має у складі аденокарциноми 3-4 стадії. Ця різниця між

Таблиця 3.67.

Показники ВЕ кластерів генів ІАГ зі статистично значущими відмінностями за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

№ кластера	Кількість зразків	% зразків	Стадія	<i>CIAS1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>KLRK1</i>	<i>IRF1</i>	<i>IL1RL1</i>	<i>IL1RI</i>	<i>IL2RA</i>	<i>MSMB</i>	<i>HLA-G</i>
1	23	62,2	2	0,172	0,081	0,004	1,086	0,171	2,836	0,090	575,126	118,105
2	6	16,2	2	0,221	0,342	0,011	27,251	0,221	2,200	0,288	471,577	208,753
3	8	21,6	3	0,153	0,106	0,010	1,047	0,179	2,093	0,092	738,096	216,979
p<0,05			*, **		*, **		**			*, **		*, ***

Примітки: 1. * - значуща різниця ВЕ між 1 та 2 кластерами; 2. ** - значуща різниця ВЕ між 2 й 3; 3. ***- значуща різниця ВЕ між 1 й 3 кластерами

кластерами є статистично значущою. Між 4 генів, що мають значущі відмінності ВЕ між кластерами три з них (*CTLA4*, *IL2RA*, *HLA-G*) дають можливість розрізнити між собою два кластери 1 та 2, які мають аденокарциноми ранніх стадій, тобто можна вважати, що за цими трьома ознаками визначено 2 молекулярні підтипи пухлин на ранніх стадіях.

Кластер 1 та 3 мають багато спільних характеристик ВЕ цих генів. Відокремити кластер 3 з більш агресивними аденокарциномами можливо завдяки значущій різниці ВЕ між кластерами 1 і 3 гена *HLA-G*.

Після кластерного аналізу окремих груп стромальних маркерів пухлин ми відібрали з цих груп гени, що мали значущі відмінності між кластерами та об'єднали у загальний сет стромальних маркерів. Проведення кластеризації 18 генів з урахуванням стадій у групі аденокарцином ПЗ виявило 3 кластери зразків, у які входили всі 100% досліджуваних аденокарцином (рис. 3.69).

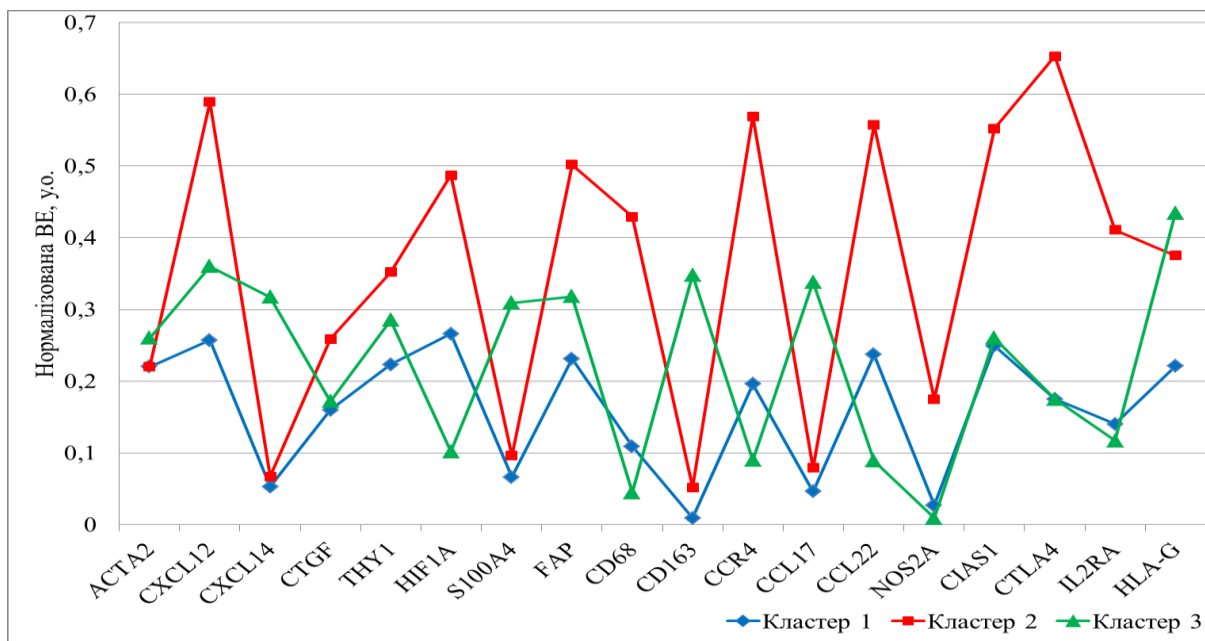


Рис. 3.69. Профілі ВЕ генів стромальних елементів (СМ1) у трьох кластерах аденокарцином ПЗ за даними кластеризації методом К-центрів

Статистичні показники трьох кластерів генів стромальних елементів в аденокарциномах зі статистично значущими відмінностями між ними за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь наведено у табл. 3.68.

З 18 досліджуваних генів значущі різниці ВЕ між кластерами виявлено лише для 13 з них. Два гени (*CXCL14*, *S100A4*) мають тенденції підвищення

Таблиця 3.68.

Показники ВЕ кластерів генів стромальних елементів в ПЗ зі значущими відмінностями за тестом Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

№ кластера	Кількість зразків	% зразків	Стадія	<i>ACTA2</i>	<i>CXCL12</i>	<i>CXCL14</i>	<i>CTGF</i>	<i>THY1</i>	<i>HIF1A</i>	<i>S100A4</i>	<i>FAP</i>	<i>CD68</i>	<i>CD163</i>	<i>CCR4</i>	<i>CCL17</i>	<i>CCL22</i>	<i>NOS2A</i>	<i>CIAS1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>IL2RA</i>	<i>HLA-G</i>	
1	20	54,1	2	109,57	0,11	3,56	13,01	1,71	1,84	19,38	0,16	2,16	2,11	0,13	0,01	0,15	0,01	0,14	0,08	0,09	118,85	
2	9	24,3	2	108,49	0,21	4,43	19,19	2,40	2,84	27,99	0,33	8,09	8,09	0,37	0,02	0,36	0,05	0,27	0,28	0,23	184,02	
3	8	21,6	3	122,58	0,14	20,25	13,71	2,05	1,11	81,57	0,21	0,96	50,16	0,06	0,08	0,06	0,00	0,15	0,08	0,08	208,96	
p<0,05			** ***		*				** ***		*	*	*	*	***	*	**	*	*	*	*	*

Примітки: 1. * - значуща різниця ВЕ між 1 та 2 кластерами; 2. ** - значуща різниця ВЕ між 2 та 3 кластерами; 3. *** - значуща різниця ВЕ між 1 та 3 кластерами

BE у кластері 3, але вони не є статистично значущими. Як і в попередніх варіантах кластеризації окремих груп генів стромальних елементів зразки аденокарцином розділено на 3 кластери, з яких 1 та 2 кластери містять переважно аденокарциноми 1-2 стадії, а кластер 3 має пухлини більш агресивні 3-4 стадії. І ці відмінності між кластерами є статистично значущими. Аденокарциноми ранніх стадій кластерів 1 та 2 відрізняються між собою профілями BE 10 генів причому для кластера 2 характерне значуще підвищення рівнів BE ($p < 0,05$) усіх цих генів: *CXCL12*, *FAP*, *CD68*, *CD163*, *CCR4*, *CCL22*, *CIAS1*, *CTLA4*, *IL2RA*, *HLA-G*. Відрізнити кластер 3 з більш агресивними аденокарциномами від кластерів 1 та 2 можна за сумою специфічних змін з цими двома кластерами, але не так однозначно просто, так як відмінностей BE між кластером 3 та іншими двома виявлено лише для одного гена *HIF1A*. Інші дев'ять значущих відмінностей BE генів (*CD68*, *CD163*, *CCR4*, *CCL17*, *CCL22*, *NOS2A*, *CIAS1*, *CTLA4*, *IL2RA*) спостерігаються лише з одним з двох кластерів (1 або 2).

Відповідний кластеру 1 ПГ кластер 1 ПАФ характеризується найнижчими рівнями експресії маркерів ПАФ, що свідчить, ймовірно, про малу кількість цих клітинних елементів і їх низьку активність в даній групі пухлин.

У цьому виді кластерного аналізу, нажаль, не виявлено відмінностей BE між кластерами для більшості генів ПАФ, тоді як при окремому аналізі цих генів вони були виявлені. Ймовірно, при спільному аналізі різних ознак програма обирає більш сильні ознаки, які надають переваги для результату кластеризації в цілому, хоча в кожному варіанті є значущі різниці між кластерами за ознакою стадій захворювання, тож можна сказати, що обидва результати можуть бути клінічно значущими, але характеризувати різні процеси та ознаки незалежно.

Завдяки методу кластеризації ми отримали специфічні кластери аденокарцином за профілями BE генів, що характеризують стан пухлин: ЕМП-пов'язані гени (П1), спільно ЕМП та гени, асоційовані з раком ПЗ та наявністю гібридного транскрипта *TMPRSS2-ERG* (ПГ). Групу кластерів аденокарцином за

профілями ВЕ генів, що характеризують стан строми пухлин: ПАФ, ПАМ (4 та 3 кластери), ІАГ та спільна кластеризація генів цих груп, що мали зміни (стромальні маркери) (СМ1). Найціннішим з наукової та клінічної точки зору є виявлення кореляцій між різними групами кластеризацій. Ми встановили коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між групами описаних вище кластеризацій табл. 3.69. Серед встановлених кореляцій виявлено високі

Таблиця 3.69.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) для шести груп кластерів

Групи молек. профілів	ПГ	ПАФ	ПАМ
ПГ	1,0000		
ПАФ	0,8219	1,0000	
ПАМ	0,5838	0,7616	1,0000
ІАГ	0,6109	0,7380	0,7827

Примітка: $p < 0,001$ - курсив ; $p < 0,0001$ – жирний

позитивні кореляції ($r^s > 0,5745$) зі значущістю $p < 0,001$ та вище. Чотири з цих кореляцій мають значення $r^s > 0,820$ з $p < 0,00001$ та відносяться до дуже високих. Найвище значення коефіцієнту кореляції між групами кластерів, що характеризують стан клітин пухлин (групи П1 та ПГ) та стан строми та мікрооточення пухлин (групи ПАФ, ПАМ, ІАГ та СМ1) мають групи П2 та ПАФ ($r^s = 0,8219$ з $p < 0,00001$) [875].

Хоча інші групи кластерів стромальних елементів (ПАМ 3 кластера, ІАГ та СМ1) також мають досить високі коефіцієнти кореляцій ($r^s = 0,5838$, $p < 0,001$; $r^s = 0,610$, $p < 0,001$; $r^s = 0,6823$, $p < 0,0001$ відповідно) з П2. Ці результати свідчать про тісний взаємозв'язок між молекулярними характеристиками клітин пухлин та стромальних елементів, особливо фібробластів та ПАФ.

Пошук підходів для молекулярного профілювання пухлин ПЗ на основі даних рівнів ВЕ показав значущі особливості ВЕ для ГТ *TMPRSS2-ERG* позитивних та негативних пухлин, певні зміни ВЕ у пухлинах з різними рівнями експресії гена *PTEN*. Але лише однієї молекулярної характеристики

для визначення окремих підтипів аденокарцином не достатньо. Завдяки методам кластеризації BE генів різних функціональних груп вдалось виявити три молекулярні підтипи аденокарцином ПЗ зі специфічними молекулярними профілями та три молекулярні підтипи, які їм відповідають для ПАФ, та в деякій мірі для ПAM та деяких імуно-асоційованих елементів.

Отже, встановлення рівнів відносної експресії 59 транскриптів генів маркерів пухлинних клітин, стромы та імунної системи дозволило виявити специфічні профілі експресії 37 генів у аденокарциномах передміхурової залози, причому 30 з них мають значущі кореляції з клініко-патологічними характеристиками пухлин, що є основною для молекулярного профілювання раку передміхурової залози. За допомогою кластерного аналізу виявлено 3 клінічно-значущі молекулярні підтипи аденокарцином як за рівнями відносної експресії груп генів маркерів пухлинних клітин, так і стромальних елементів. Встановлено, що найбільшу кореляцію між молекулярними підтипами пухлинних клітин мають підтипи пухлино-асоційованих фібробластів та макрофагів, що свідчить про активну участь та канцерогенний вплив цих стромальних елементів.

Результати цього підрозділу опубліковані в наступних роботах: [730, 737, 856, 857, 858, 861, 875].

3.7. Визначення різних типів біомаркерів та створення панелей для діагностики онкологічних захворювань на основі порушень ДНК та експресії генів у пухлинах

3.7.1 Розробка панелей потенційних ДНК біомаркерів на основі генетичних та/або епігенетичних порушень для діагностики епітелійних новоутворень на основі результатів NotI -мікропанелей. За результатами NotI-мікропанелей нами отримано низка генів з генетичними та/або епігенетичними змінами у доброякісних та злоякісних пухлинах яєчника різної стадії захворювання [551, 552]. Розрахунки панелей були проведені на основі

даних тесту Фішера та критерію Хі-квадрат з використанням методу опорних векторів (метод класифікатора з максимальним зазором) [867-878], як одного з методів машинного навчання (табл. 3.70).

Ці розрахунки дозволили виявити сети генів як для раннього виявлення, так і для розрізнення між доброякісними та злоякісними пухлинами й злоякісними пухлинами 1-2 стадії та 3-4 стадії.

Таблиця 3.70.

Набори генів-маркерів для виявлення та розрізнення пухлин яєчника

Застосування	Набір генів	Статистичні параметри набору
Раннє виявлення	<i>NKIRAS1/RPL15, THRB, RBPS3 (CTDSPL), IQSEC1, NBEAL2, ZIC4, LOC285205, FOXP1</i>	Sp = (94 ± 5)% Sn = (72 ± 11)% p < 0,01
Розрізнення доброякісних та злоякісних пухлин яєчника	<i>NKIRAS1/RPL15, THRB, RBPS3 (CTDSPL), IQSEC1, NBEAL2, ZIC4, LOC285205, FOXP1</i>	Sp = (71 ± 17)% Sn = (72 ± 11)% p = 0,04
Розрізнення злоякісних пухлин яєчника 1-2 та 3-4 стадії	<i>LOC285205, CGGBP1, EPHB1, NKIRAS1/RPL15</i>	Sp = (88 ± 12)% Sn = (80 ± 13)% p < 0,01

Примітки: 1. Sp – специфічність; 2. Sn – чутливість

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

же набір, що і для виявлення раку. Якщо метилювання та/або делеція знайдено у двох або більше з вищезазначених біомаркерів, то зразок буде визнаний раком. Чутливість цього набору дорівнює $(72 \pm 11)\%$ і специфічність $(71 \pm 17)\%$. Для розмежування стадій 1-2 і стадій 3-4 раку яєчника найбільш перспективними показали себе біомаркери *LOC285205*, *CGGBP1*, *EPHB1* та *NKIRAS1 / RPL15*. Якщо виявлено метилювання та/або делецію в 1 або більше з цих біомаркерів, то зразок буде визнаний як пухлина з 3-4 стадією. При цьому чутливість набору дорівнює $(80 \pm 13)\%$, а специфічність $(88 \pm 12)\%$. Стадії 3-4 мають метилювання та/або делеції та вважаються позитивним результатом, а стадії I + II - негативним при цьому аналізі.

Таким чином, запропонований набір з 10 маркерів (*NKIRAS1 / RPL15*, *THRB*, *RBPS3 (CTDSPL)*, *IQSEC1*, *NBEAL2*, *ZIC4*, *LOC285205*, *FOXP1*, *CGGBP1*, *EPHB1*) дозволить розрізняти / діагностувати більшість випадків епітелійних пухлин яєчника з чутливістю та специфічністю вище, ніж 71% і до 94% [552].

Розробка наборів маркерів для ідентифікації та дискримінації пухлин передміхурової залози на основі даних NotI-мікропанелей (табл. 3.71)

Таблиця 3.71.

Набори генів-маркерів для виявлення та розрізнення ПЗ

Застосування	Набір маркерів	Статистичні параметри набору
Виявлення А, і П (Агр+Неагр П)	<i>BHLHE40</i> , <i>FOXP1</i> , <i>LOC285205</i> , <i>ITGA9</i> , <i>RBSP3</i>	Sp = 94% Sn = 94% Ac = 94% p < 0,01
Розрізнення між А і Неагр П	<i>FAM19A4</i> , <i>CAND2</i> , <i>MAP4</i> , <i>KY</i> , <i>LRRC58</i>	Sp = 73% Sn = 93% Ac = 83% p < 0,01
Розрізнення між Агр П та А+ Неагр П	<i>LOC440944/SETD5</i> , <i>VHL</i> , <i>CLCN2</i> , <i>OSBL10/ZNF860</i> , <i>LMCD1</i>	Sp = 97% Sn = 100% Ac = 97% p < 0,01

Примітки: 1. А – аденоми; 2. П – аденокарциноми ПЗ; 3. Агр П – аденокарциноми 3-4 стадії з метастазами; 4. Неагр П - аденокарциноми 1-2 стадії без метастазів; 5. Sp – специфічність; 6. Sn – чутливість; 7. Ac – точність

проводилась також як і панелей раку яєчника з використанням одного з методів машинного навчання, а саме методу опорних векторів [554, 879, 880]. Чутливість, специфічність і точність наборів обчислювалися як частка істинних позитивних результатів, істинних негативних результатів і істинних позитивних плюс істинні негативні результати відповідно. Для оцінки прогнозної потужності розроблених наборів використано коефіцієнт Джині [881, 882].

Отже, використовуючи наші дані з NotI-мікропанелей, ми спробували сконструювати моделі прогнозування для виявлення раку передміхурової залози та дискримінації між агресивними та неагресивними підтипами.

Для виявлення пухлин передміхурової залози можна запропонувати набір з шести маркерів: *BHLHE40*, *FOXP1*, *LOC285205*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)* і *FGF12*. Аналіз вважається позитивним, тобто пухлину або аденому діагностовано при виявленні в двох або більше делецій та/або метилювання у маркерних генах. За цієї умови, як чутливість, так і специфічність цього набору були 94% для розглянутої вибірки. Коефіцієнт Джині був у діапазоні 0,92–0,99 (рис. 4, перший набір). Однак ці значення потребують подальшого уточнення, використовуючи додаткові вибірки.

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

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

використовувати повний сет з 16 маркерів, а потім проводити статистичну обробку результатів для деталізації та розрізнення типу пухлини.

3.7.2. Потенційні фармакологічні біомаркери для встановлення діапазонів потенційної фармакологічної чутливості за показниками ВЕ генів у раці передміхурової залози. Фармакологічні біомаркери - один з типів біомаркерів, який останнім часом стає більш актуальним з розробкою сучасних засобів мішенної терапії, у тому числі імунотерапії. Щоб довести, що якийсь ген може бути реальним фармакологічним біомаркером потрібно проведення спеціальних клінічних досліджень з введенням препаратів що впливають на гени-мішеней, кількісною оцінкою експресії цього гена мішені на рівні мРНК, білка, або проведення генетичних тестів при наявності даних про зміну чутливості до препарату при появі певних генетичних порушень. Ці дослідження повинні бути проведені паралельно з оцінкою ефективності дії досліджуваного препарату. Але першим кроком повинно передувати дослідження експресії цих генів мішеней та вивчення чи є якісь зміни у пухлинах на різних етапах канцерогенезу у порівнянні з нормальними або умовно-нормальними тканинами. Встановлення можливих граничних значень змін, які можуть бути клінічно значущими.

Серед досліджуваних нами генів є низка генів, які можуть бути потенційними фармакологічними біомаркерами чутливості та ефективності терапевтичних засобів для лікування пухлин [875].

Сьогодні загальноновизнано, що одним з найважливіших інструментів прогнозування правильного вибору лікування є чутливість пухлинних клітин до інгібіторів андрогенного рецептора (AR). Це препарати першої лінії лікування раку ПЗ [883-885]. Отже, висока експресія AR є сприятливою для ефективної терапії. Наступний потенційний фармакологічний маркер – ген *PTEN*. Необхідно відзначити, що низька експресія гена- супресора *PTEN* або мутації в пухлинах ПЗ призводять до кращої відповіді на інгібітори сигнального шляху РІЗК / АКТ / mTOR. Для інгібування активності цього шляху розроблено ефективні препарати для лікування раку передміхурової залози [886, 887]. Їх

ефективність залежить від багатьох факторів, і, як стало відомо останнім часом, від наявності експресії гена *PTEN* [888]. Важливо, що сам білок *PTEN* є інгібітором цього шляху. Тому мутаційний стан і рівні експресії гена *PTEN* слугують для стратифікації пацієнтів для вибору терапії [889].

Розробка специфічних препаратів для лікування раку передміхурової залози є досить повільною: лише п'ять нових лікарських засобів були схвалені FDA за останні 8 років [890]. Однак був запропонований інший підхід - перепозиціонування лікарських засобів, тобто коли для лікування раку застосовують добре відомі препарати для інших захворювань [891]. Такими препаратами є, наприклад, інгібітори білків, які беруть участь у метаболізмі ліпідів, а саме інгібітори *HMGCR* (статици) [892, 893], інгібітори *COX-2* [894] і *FASN* [895-897]. Більш того, важливо оцінювати рівні експресії гена *CTLA4* внаслідок підвищеного використання імунотерапії при лікуванні раку [898].

Рівні ВЕ семи генів мішеней інгібіторних препаратів, оцінювали в групах аденокарцином, УНТ та аденом, як описано нами раніше [720, 754, 779]. Несподівано, не виявлено істотних відмінностей у ВЕ цих генів між групами П і УНТ. Тому всі розрахунки проводились для двох груп П та А у якості контролю. Дані описової статистики наведено у табл. 3.72.

Аналіз рівнів ВЕ в групах П і А показав три типи змін: (1) значуще знижені рівні експресії генів у П - *AR 1 isof*, *PTEN*; (2) значуще збільшені рівні експресії у П в порівнянні з А - *COX2*, *FASN*, *CTLA4*; (3) ніяких значущих змін ВЕ не виявлено - *HMGCR*, *LDLR*. Слід зазначити, що всі гени проявляли дуже високу варіабельність значень експресії в окремих пухлинах.

Ми розділили потенційну ефективність (або чутливість) до протиракової терапії на діапазони згідно рівням ВЕ генів як високу, середню, нижче середнього, низьку.

Рівні ВЕ генів в групі аденом використовували в якості контролю, тому перший пороговий рівень був значенням медіани А для генів із змінами ВЕ типу (1). Цей рівень розділяє високий і середній діапазони ефективності.

Наступний пороговий рівень був 25-й перцентиль групи А. Він розділяв ефективність на середній та нижче середнього діапазони. Ці значення близькі

Таблиця 3.72.

ВЕ фармакологічних маркерів у аденокарциномах (П) та аденомах (А) ПЗ

Гени	Групи	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні*
<i>AR 1 isof</i>	П	1,377	0,413	3,353	0,911	2,228	0,021
	А	2,129	0,879	4,936	1,623	2,672	
<i>PTEN</i>	П	8,762	2,278	25,232	6,354	12,322	0,015
	А	16,989	5,875	90,619	8,964	22,065	
<i>COX2</i>	П	1,550	0,291	10,554	0,777	2,319	0,019
	А	0,542	0,152	4,647	0,256	1,053	
<i>FASN</i>	П	3,132	0,351	34,230	1,744	8,048	0,031
	А	2,252	0,191	4,567	1,241	2,485	
<i>HMGCR</i>	П	0,393	0,043	9,724	0,221	0,712	0,058
	А	0,631	0,331	1,717	0,469	0,901	
<i>LDLR</i>	П	0,647	0,052	4,890	0,443	1,227	0,677
	А	0,605	0,223	1,415	0,360	0,835	
<i>CTLA4</i>	П	0,084	0,007	0,425	0,053	0,175	0,016
	А	0,039	0,006	0,219	0,030	0,071	

Примітка. * - Тест Дана-Бонферроні для множинних порівнянь

до медіани групи П. Останній пороговий рівень був 25-м перцентилем групи П; він розділяє діапазони чутливості на нижче середнього та низький.

Для другого типу змін ВЕ ми пропонуємо додатковий діапазон- дуже високий рівень чутливості / ефективності. Його пороговим рівнем є медіана групи аденокарцином.

Третій тип змін ВЕ дозволяє нам виявляти ефективність аналогічно першому типу, за винятком необхідності додаткового дуже високого рівня при умові, якщо ВЕ 75-го перцентиля П є вищою, ніж у групі аденом.

Результати виявлення та розділу на діапазони потенційної фармакологічної чутливості для семи генів-маркерів згідно описаних порогових рівнів для 37 аденокарцином наведено на рис. 3.70. Кожен ген біомаркер має

максимально чотири, мінімально три діапазони потенційної фармакологічної ефективності для препаратів інгібіторів білків, що кодують ці гени.

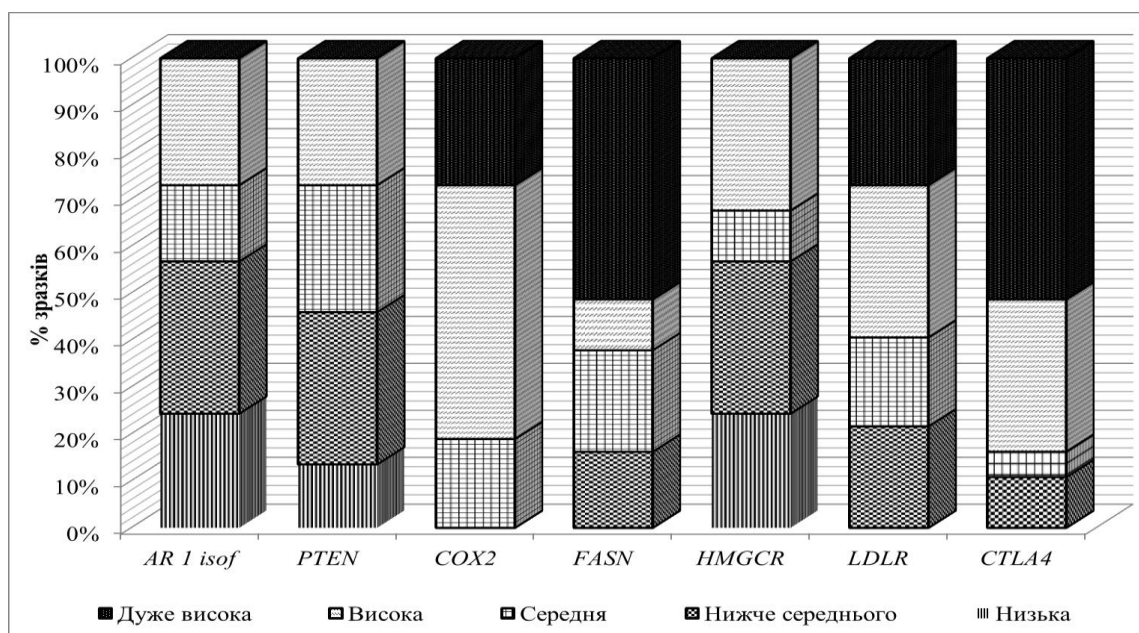


Рис. 3.70. Розподілення за діапазонами потенційної фармакологічної чутливості 37-и зразків аденокарцином ПЗ для семи генів-маркерів

Важливо відзначити, що порогові рівні експресії гена *AR 1* ізоформи дуже схожі на рівні ВЕ для трьох підтипів аденокарцином, що характеризовані нами раніше [730, 875]. Більш того, для гена *PTEN* рівні його ВЕ у пухлинах обернено пов'язані з фармакологічною ефективністю інгібіторів mTOR шляху.

Отримані результати є нашими припущеннями на основі аналізу рівнів ВЕ та характеристик змін ВЕ у групах пухлин передміхурової залози. Для встановлення реальної чутливості та ефективності протиракової терапії необхідно провести клінічні дослідження.

З іншого боку, ці результати свідчать про наявність зразків з різною потенційною чутливістю до протиракової терапії. Наприклад, різниця між мінімальним та максимальними значеннями ВЕ генів *HMGCR*, *FASN*, *LDLR*, *CTLA4* перевищує 100 разів.

Потенційними фармакологічними маркерами може бути ще низка з досліджуваних генів. Наприклад, поява ендогенної експресії пролактину у пухлинах передміхурової залози, який не продукується у нормальній тканині

ПЗ, є маркером резистентності до хіміотерапії особливо при наявності експресії гена *PRLR* [728, 899, 900]. Підвищення експресії гені-маркерів ПАФ та ПАМ свідчить про підвищення резистентності до терапії раку ПЗ [901, 902]. Крім того вони самі є мішенями для розробки антиракових препаратів [903, 904].

Отже, всі розрахунки, це наші припущення згідно отриманих результатів, що свідчать про наявність специфічних молекулярних підтипів аденокарцином з різними рівнями ВЕ багатьох генів при однакових та відмінних клініко-патологічних характеристиках зразків та даних літератури згідно дійсно різної чутливості пухлин до дії різних підходів терапії. Для доведення до практичного використання цих даних необхідно дослідити реальні ефекти препаратів та пов'язати їх з дійсними рівнями ВЕ генів.

3.7.3. Створення панелей експресійних РНК біомаркерів на основі даних відносної експресії генів у зразках раку передміхурової залози.

3.7.3.1. Модифікація формату даних ВЕ для розробки експресійних панелей біомаркерів на основі підходів машинного навчання. В даний час відомо декілька статистичних тестів, програм та підходів, які обчислюють різні комбінації діагностичних параметрів (Sp , Sn , Ac та інші) для одного потенційного біомаркера або набору біомаркерів [532, 538, 544]. Багато з них не є вільними для досліджень; деякі з них розроблені центрами біоінформатики для конкретних завдань і не можуть бути використані для інших цілей. Ще не існує офіційно прийнятих STARD (Standard ad Reporting of Diagnostic accuracy studies) методів встановлення, підтвердження та перевірки експресійних біомаркерів або їх панелей [540].

Методи машинного навчання, що описуються байєсівським статистичним підходом, широко використовуються для моделювання та оцінки генетичної, епігенетичної, фармакогеномної взаємодії при багатofакторних захворюваннях та оцінки біомаркерів різних типів. Серед них є PanelomiX, ROC та MDR аналіз [538, 543, 545, 547]. Але використання цих підходів потребує їх адаптації до потреб розробки експресійних панелей біомаркерів у зв'язку з особливостями характеру даних відносної експресії та їх інтерпретації. Отже, першим нашим

завданням розробки експресійних панелей є пристосування даних відносної експресії під особливості MDR аналізу.

Метод MDR потребує дихотомічних даних. Він порівнює 2 вибірки та використовує багато статистичних тестів з комбінаторним аналізом зазначених атрибутів. Ця конфігурація відповідає діагностичній матриці методів пошуку біомаркерів [548]. Ми поставили завдання розробити алгоритм для адаптування аналізу MDR для оцінки експресії генів та розробки експресійних панелей біомаркерів. Реалізація цього завдання включає наступні кроки: вибрати групу потенційних генів-прогностичних факторів, які мають значущі відмінності між досліджуваними групами, проаналізувати ВЕ генів за допомогою статистичних методів на наявність можливих класифікаторів, визначити порогове значення рівнів ВЕ для розподілу зразків на групи, перевести неперервні дані ВЕ у бінарні значення.

Після цього стає можливим обробка отриманих даних за допомогою підходу MDR для аналізу можливих варіантів вибору форми найбільш статистичних значущих варіантів наборів даних, найбільш підходящих для експресійних панелей. В результаті, ми отримуємо можливість створення експресійних панелей за допомогою методу MDR.

Ми виявили та описали ВЕ з 57 транскриптів генів з різних функціональних груп: 1) гени, пов'язані з ЕМП, 2) гени, пов'язані з раком передміхурової залози, 3) ПАФ-асоційовані гени, 4) ПАМ- пов'язані гени 5) імуно-асоційовані гени (ІАГ) в аденокарциномах ПЗ, парних умовно-нормальних тканинах (УНТ) і 20 аденомах [720, 730, 779]. Дуже висока дисперсія ВЕ у групах УНТ у пацієнтів з різними клінічними характеристиками не може дати можливості виявити незмінні або нормальні рівні ВЕ. Тому ВЕ групи аденом вирішено використовувати у цьому дослідженні в якості контрольної групи для розробки експресійних панелей, незважаючи на те, що аденоми передміхурової залози – це гіпертрофічне захворювання з власними механізмами розвитку [905]. Тим не менш, аденоми є звичайною нормою або

контрольною групою в багатьох дослідженнях для вивчення генетичних, епігенетичних, експресійних змін у злоякісних пухлинах ПЗ [554, 906].

Після визначення переліку генів завданням нашої роботи було виявлення потенційних генів-предикторів (або класифікаторів), які могли б класифікувати аденокарциноми та аденоми на групи за рівнями ВЕ [907].

Першим методом розділення аденом і аденокарцином, який ми використали, був дискримінант-байєс однофакторне розділення для категоріальних і порядкових предикторів (*discriminant-bayes univariate splits for categorical and ordered predictors*). Цей метод вибирає найбільш відповідні групові предиктори з високим значенням для групової дискримінації і конструює класифікаційні дерева. Нижче наведені приклади.

Цим методом проаналізовано ВЕ 20 транскриптів ЕМП (19 генів). Серед них виявлено гени / транскрипти з високими значеннями важливості предиктора (важливості прогнозу) для групування П/А (Т/А): *HOTAIR*, *KRT18*, *PCAZ*, *AR*, *PTEN*, *MMP9*. За рівнями ВЕ цих генів можна розділити досліджувані зразки на аденоми і аденокарциноми. Приклад дерева класифікації для генів ЕМП показаний на рис. 3.71. Це дерево класифікації має два гени предиктори (класифікатори) (*KRT18* і *HOTAIR*) для дискримінації зразків П/А і трьох варіантів рівнів експресії генів (кінцевих вузлів). Будь-якій класифікація працює з «Правилами якщо-то». Тобто при кожному розділенні між ознаками працюють певні умови/правила розподілу. Це дерево класифікації має 2 правила: 1) якщо ВЕ гена *KRT18* > 18,314, то зразки класифікуються як - 1 (аденокарциноми) (30 зразків), в протилежному випадку (ВЕ гена *KRT18* ≤ 18,314) - невідомі зразки (синій квадрат) (27 зразків); 2) якщо ВЕ гена *HOTAIR* ≤ 0,00396, то зразки 0 (аденоми), в протилежному випадку (ВЕ гена *HOTAIR* > 0,00396) - 1 (аденокарциноми). На додаток до класифікацій «Якщо-то», класифікації мають порогові рівні ВЕ, які поділяють зразки на групи. У результаті класифікації ми отримали 41 зразок як аденокарциноми і 16 зразків як аденоми, тоді як у нас було 37 аденокарцином і 20 аденом для аналізу.

Це означає, що принаймні 4 зразка аденоми були введені в неправильну групу. Ми маємо 4 помилкових позитивних результати та зменшену специфічність цього дерева класифікації.

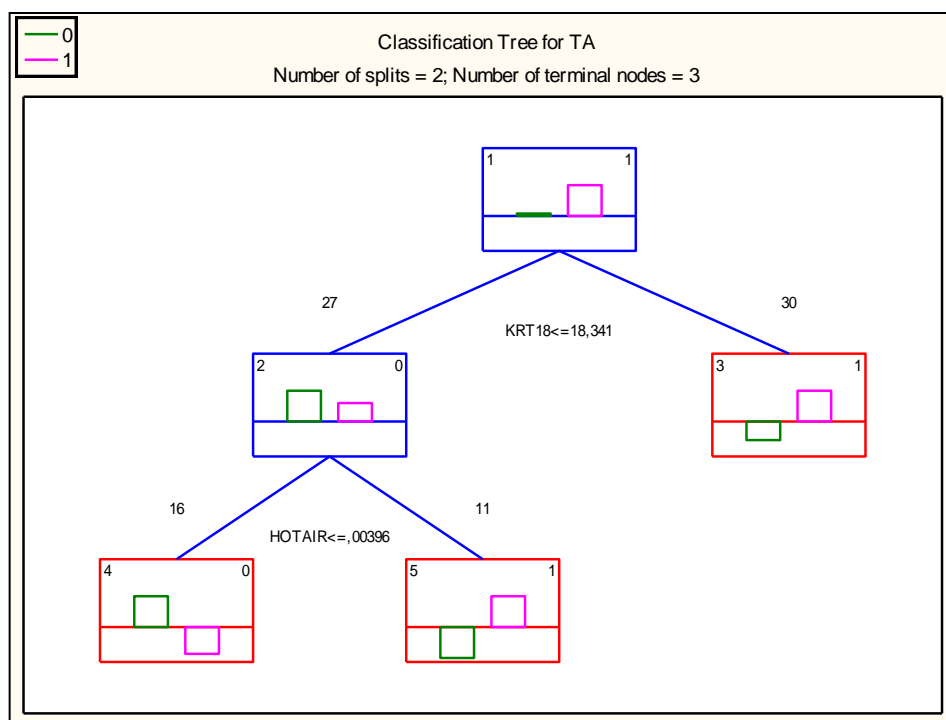


Рис. 3.71. Дерево класифікації для стратифікації аденокарцином (Т (1)) та аденом (А (0)) за рівнями ВЕ генів ЕМП: сині прямокутники – початковий або проміжні вузли; червоні прямокутники-термінальні вузли (з класифікованими зразками); числа над вузлами - розмір вибірки у вузлі; номер верхнього правого кута - група зразків А або Т; номер верхнього лівого кута - номер вузла

Наступною групою транскриптів, які ми вивчали гени, асоційовані з раком ПЗ (14 транскриптів). У цій групі метод однофакторного розділення виявив гени з високим значенням прогнозування для дискримінації групи П/А: *SRD5A2*, *PRLR*, *ESR1*. Цей статистичний метод побудував дерево класифікації тільки з геном *SRD5A2* (рис. 3.72).

Результат цієї класифікації є дуже низьким. Він дає високий відсоток помилок класифікації. Знайдено лише 6 зразків для групи аденоми, тоді як у цій групі - 20 зразків. Цей високий рівень помилки означає, що необхідно більше ознак для правильної класифікації, але цей метод їх не зміг вичленувати.

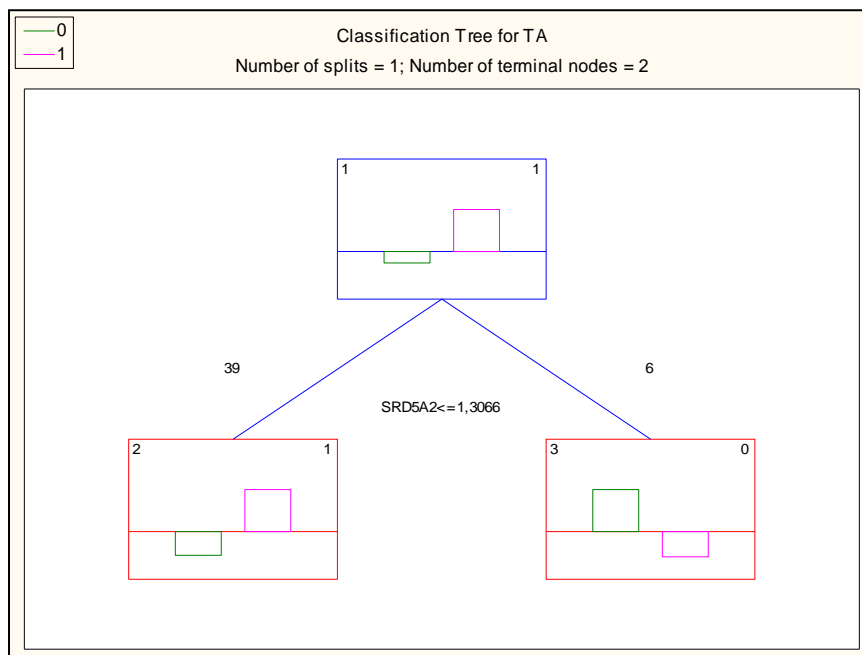


Рис. 3.72. Дерево класифікації для стратифікації аденокарцином (Т (1)) і аденом (А (0)) за рівнями ВЕ гена *SRD5A2*: червоні прямокутники-термінальні вузли (з класифікованими зразками); числа над вузлами - розмір вибірки у вузлі; номер верхнього правого кута - група зразків А або Т; номер верхнього лівого кута - номер вузла

Серед 8 генів групи ПАФ виявлено гени з високим значенням важливості передбачення (пре диктора) для дискримінації групи П/А: *CXCL12*, *CXCL14*, *THY1*. Дерево класифікації показано на рис. 3.73. Це дерево класифікації розділило дослідні зразки як 40 зразків аденокарциноми та 17 аденоми ПЗ. 3 зразка аденоми знаходяться в неправильній групі. Ця помилка є набагато меншою ніж в попередньому прикладі класифікаційного дерева та ніж ЕМП генів, але вона все ще не точна, враховуючи аденоми, що входять до групи злоякісних пухлин, що означає наявність перевищення діагностики. Для лікарів ця ситуація краща, ніж ситуація з помилковими негативними зразками, коли хвороба присутня, але при аналізі знайти її не вдалося. Однак це дуже стресова ситуація для пацієнтів, які не мають хвороби, але вона в них діагностована. Це дуже складний вибір для дослідників.

Це означає, що набір повинен мати дуже високу як чутливість, так і специфічність і як наслідок певні LHR + і LHR-.

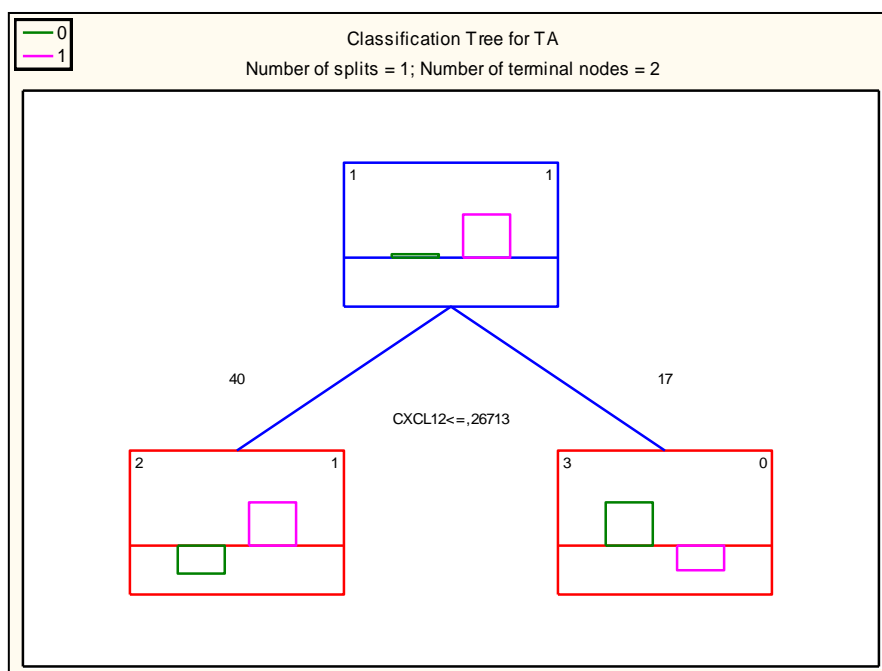


Рис. 3.73. Дерево класифікації для стратифікації аденокарцином (Т (1)) і аденом (А (0)) за рівнями ВЕ гена *CXCL12*: червоні прямокутники-термінальні вузли (з класифікованими зразками); числа над вузлами - розмір вибірки у вузлі; номер верхнього правого кута - група зразків А або Т; номер верхнього лівого кута - номер вузла

Гени з групи ПАМ (6 генів) показали високу прогностичну важливість для дискримінації між Т/А групами: *CCR4*, *CCL22*, *CCL17*, *CD68*. Приклад дерева класифікації наведено на рис. 3.74. Дерево класифікації ТАМ генів має найбільшу кількість генів-класифікаторів у ньому (*CCL17*, *CCL22*, *CD68*, *CCR4*). Ця класифікація має 4 правила «якщо-то» і 4 граничні рівні ВЕ генів для класифікації. В результаті виявлено 42 аденокарциноми (1) з 37 і тільки 15 аденом (0) з 20 зразків. Тобто, знову ми стикаємось з перевищенням діагностування.

Для останньої групи ІАГ генів (9 генів), нажаль цей підхід не виявив будь-яких значущих генів-предикторів, але інші класифікаційні та регресійні моделі дерев (С&RT) показали високу прогностичну важливість для всіх цих генів у груповій дискримінації П/А. Найбільші рівні важливості передбачення (предиктора) мають гени: *IL1R1*, *CTLA4*, *MSMB*.

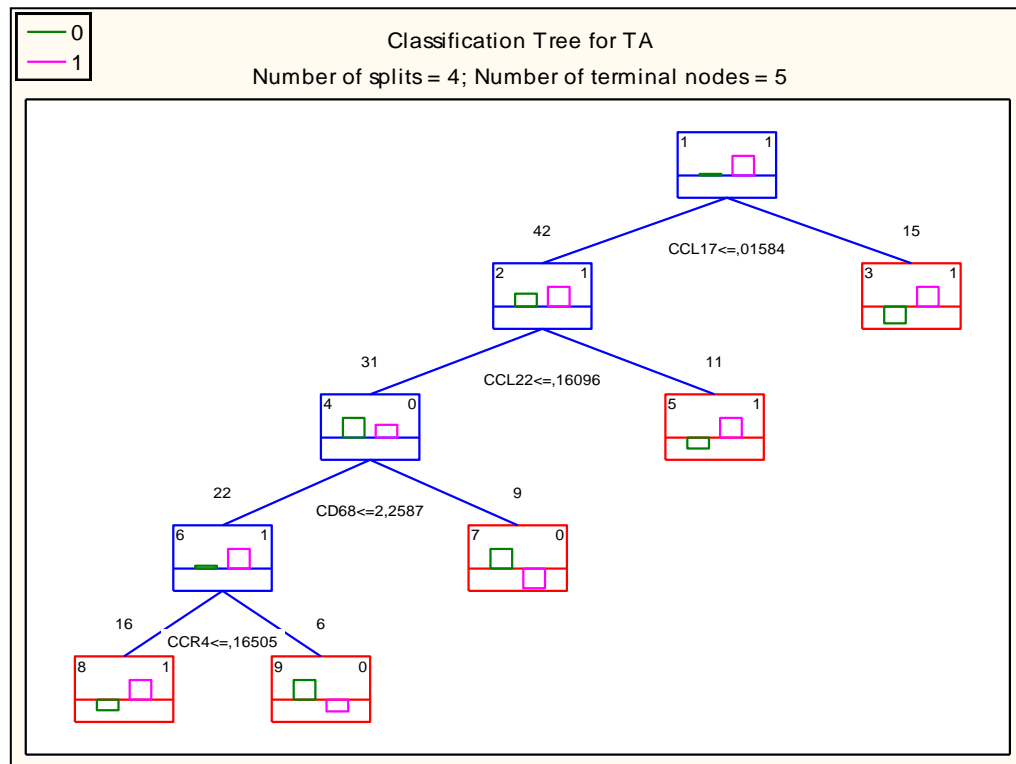


Рис. 3.74. Дерево класифікації для стратифікації аденокарцином (Т (1)) та аденом (А (0)) за рівнями ВЕ ПАМ генів: сині прямокутники – початковий або проміжні вузли; червоні прямокутники-термінальні вузли (з класифікованими зразками); числа над вузлами - розмір вибірки у вузлі; номер верхнього правого кута - група зразків А або Т; номер верхнього лівого кута - номер вузла

Отже, методи класифікації за рівнями ВЕ досліджуваних генів для ідентифікації групових предикторів виявили гени (близько 20 генів) з високим значенням прогнозування для стратифікації П/А груп. Всі ці гени мають значущі зміни ВЕ між аденокарциномами і аденомами ПЗ за результатами наших досліджень [186]. Ці гени обрано для подальшого аналізу. В результаті серед 57 транскриптів з 5 груп генів: ЕМТ-пов'язані, PrCa-асоційовані, ПАФ, ПАМ, ІАГ, ми вибрали 30 генів (31 транскрипт) зі значущими відмінностями ВЕ між А і П для розробки експресійних панелей. Крім того, ми врахували відмінності ВЕ у групі аденокарцином з різними стадіями та СГ.

Наступним завданням після відбору генів для розробки експресійних панелей є визначення порогового рівня ВЕ, який розділяє зразки з незмінною ВЕ і є індивідуальним для кожного гена. Виходячи з наших попередніх

досліджень, ми виявили, що різниця ВЕ у 2 рази (підвищення або зниження) є значущими рівнями для ідентифікації групових відмінностей [720, 730, 779]. Ми вибрали його як порогове значення рівня ВЕ від медіани групи аденом, яку ми беремо як контрольну групу для переведення неперервних значень ВЕ до дихотомічних (бінарних) значень. Ці дані наведені у табл. 3.73 [907].

Таблиця 3.73.

Зміни ВЕ генів для визначення порогового рівня для групи аденокарцином

ПЗ в порівнянні з групою аденом для MDR аналізу

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

Ми виявили 31 транскрипт зі значущими різницями рівнів ВЕ між аденокарциномами передміхурової залози в порівнянні з групою аденом. Серед них 22 гени / транскрипти з підвищеною ВЕ в групі П у порівнянні з А, і 9 генами зі зниженими рівнями ВЕ в П серед 5 груп досліджуваних генів. Ці транскрипти будуть використані для проведення MDR аналізу та розробки панелей експресійних біомаркерів.

3.7.3.2. Створення експресійних панелей для діагностики та розрізнення раку передміхурової залози. Використовуючи дані ВЕ генів, що наведені в Таблиці 1 ми підготували дані ВЕ для MDR аналізу шляхом переведення їх у бінарні значення. Незмінні рівні ВЕ означили “0”, змінні (вгору або вниз) рівні ВЕ - означають “1”. Зразки передміхурової залози мають 2 класи: П і А. Для аналізу використали наступні параметри програми MDR: Аналіз невизначених даних - точний тест Фішера ($p < 0,05$), діапазон кількості атрибутів - всі гени досліджуваної групи, невизначені данні - клас 1 (П), Метод пошуку конфігурації - вичерпний і випадковий, Коефіцієнт перехресної перевірки - 10, Вибір фільтра – χ -квадрат.

Щоб розробити діагностичні експресійні набори, необхідно зрозуміти, які статистичні параметри вони повинні мати. Відомо 4 різних діагностичних рівнів біомаркерів/панелей біомаркерів: відмінна, хороша, погана і не має діагностичної цінності [533, 536]. Ми зацікавлені у відмінних і хороших діагностичних значеннях. Найвищою є відмінна діагностична цінність, яка має відповідні параметри точності $A_c > 0,9$, $LHR + > 10$, $LHR - < 0,1$. Параметри $LHR + / -$ базуються на чутливості (S_n) та специфічності (S_p) ($> 0,9$). Похідні параметри з $LHR + / -$ є $AUC_{ROC} (> 0,9)$ та / або Odds Ratio (> 100). Гарне діагностичне значення має наступні параметри: точність (A_c) 0,75-0,9, $LHR + 5-10$, $LHR - 0,1-0,2$, $AUC_{ROC} 0,75-0,9$ та / або Odds Ratio 25-100. Чутливість і специфічність 0,75 - 0,9.

В MDR аналізі спочатку ми аналізували кожен з 5 груп генів окремо, але ми не отримали високих статистичних значень для експресійних панелей. Тому ми вирішили об'єднати групи генів. Першу групу становлять пухлино-асоційовані гени (ЕМП та гени, асоційовані з раком ПЗ). Друга група є асоційованою з пухлинним мікрооточенням (ПАФ, ПАМ, ІАГ групи).

MDR-аналіз першої групи генів (ЕМП та гени, асоційовані з раком ПЗ) показав багато кластерів генів у дендрограмі з високим рівнем передбачуваності у прогнозі для П/А стратифікації (червоні та сині лінії) (рис. 3.75). Вони можуть бути основою набору дискримінації (розділення) П/А груп зразків ПЗ.

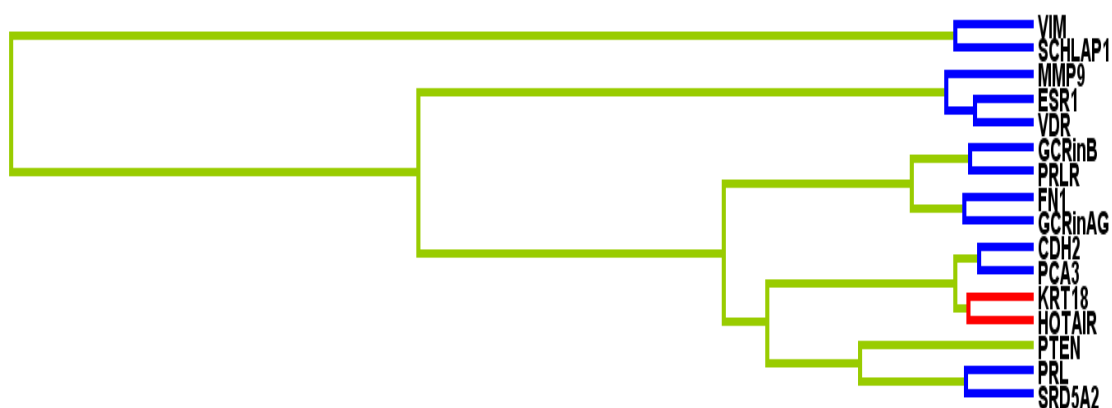


Рис. 3.75. Дендрограма ЕМП та генів, асоційованих з раком ПЗ у мережі для П/А стратифікації: червоні та сині лінії – найбільш сильні гени-предиктори та їх взаємодії

Комбінаторний аналіз між 16-ю генами цієї групи виявив наступні комбінації генів з високими значеннями статистичних параметрів (табл. 3.74). Діагностичні параметри визначених наборів зростали при додаванні генів від одного до трьох у наборі/панелі. Максимум статистичних параметрів мають набори з 3-5 генами. Їх точність і чутливість відповідають відмінному діагностичному рівню, але специфічність і Odds Ratio відповідає хорошему діагностичному рівню. Подальше збільшення генів у сеті не призводило до покращення статистичних результатів та значно ускладнювало правила описання результатів діагностики. Необхідно отримати статистичні параметри, які мають вимінну діагностичну цінність, перевіряючи інші гени з високими прогностичними рівнями.

MDR аналіз другої групи генів (ПАФ, ПАМ, ІАГ) показав, що гени на дендрограмі мають чотири кластери у мережі (рис. 3.76), що мають високі рівні передбачуваності для прогнозування П/А стратифікації (червоні та сині лінії).

Комбінаторний аналіз 15 генів ПАФ, ПАМ, ІАГ виявив наступні комбінації генів з високими значеннями статистичних параметрів наборів даних потенційних експресійних панелей (табл. 3.75).

Згідно отриманих результатів найвищі рівні точності, чутливості, специфічності та Odds Ratio мають набори з 3-4 генами в сеті у цій

Таблиця 3.74.

Набори ЕМП та генів, асоційованих з раком ПЗ з найвищими статистичними параметрами від 1 до 5 атрибутів

Набори генів	Статистичні параметри
<i>HOTAIR</i>	Accuracy: 0,7193 Sensitivity: 0,6216 Specificity: 0,9 Odds Ratio: 14,7857 χ^2 : 14,3459 (p = 0,0002)
<i>PCA3, HOTAIR</i>	Accuracy: 0,8772 Sensitivity: 0,8649 Specificity: 0,9 Odds Ratio: 57,6 χ^2 : 31,5551 (p < 0,0001)
<i>KRT18, HOTAIR, ESRI</i>	Accuracy: 0,9123 Sensitivity: 0,9459 Specificity: 0,85 Odds Ratio: 99,1667 χ^2 : 37,0115 (p < 0,0001)
<i>KRT18, MMP9, PCA3, HOTAIR, ESRI</i>	Accuracy: 0,9123 Sensitivity: 0,9459 Specificity: 0,85 Odds Ratio: 99,1667 χ^2 : 37,0115 (p < 0,0001)

досліджуваній групі генів. Точність і специфічність відповідають доброму діагностичному рівню, тоді як чутливість і Odds Ratio відповідають відмінному діагностичному значенню рівню. Збільшення кількості генів в аналізованих

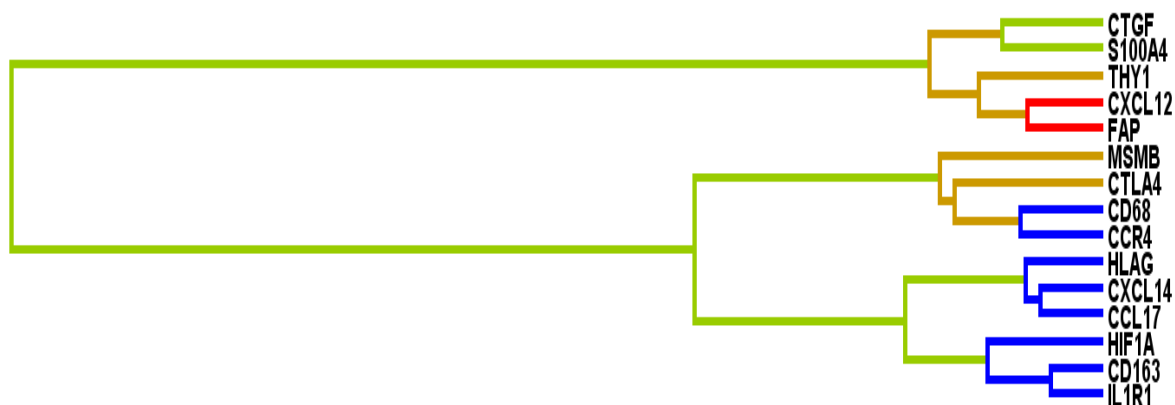


Рис. 3.76. Дендрограма ПАФ, ПАМ, ІАГ у мережі для П/А стратифікації: червоні та сині лінії – найбільш сильні гени-предиктори та їх взаємодії

наборах даних до 5 і більше призводить до зниження статистичних параметрів у цій групі генів.

Згідно з нашими описаними результатами, можна припустити, що MDR аналіз у великої кількості генів може дати кращі статистичні параметри.

Таблиця 3.75.

Набори ПАФ, ПАМ, ІАГ генів з найвищими статистичними параметрами

Набори генів	Статистичні параметри
<i>CXCL14</i>	Accuracy: 0,8421 Sensitivity: 0,8378 Specificity: 0,85 Odds Ratio: 29,2778 χ^2 : 25,5195 (p < 0,0001)
<i>CXCL14, IL1R1</i>	Accuracy: 0,8772 Sensitivity: 0,9189 Specificity: 0,8 Odds Ratio: 45,3333 χ^2 : 30,1946 (p < 0,0001)
<i>CXCL12, CXCL14, HIF1A</i>	Accuracy: 0,8947 Sensitivity: 0,973 Specificity: 0,75 Odds Ratio: 108,0 χ^2 : 33,6083 (p < 0,0001)
<i>CXCL12, CXCL14, HIF1A, CD163</i>	Accuracy: 0,8947 Sensitivity: 0,973 Specificity: 0,75 Odds Ratio: 108,0 χ^2 : 33,6083 (p < 0,0001)

Останній варіант MDR аналізу був виконаний з усіма відібраними 30 генами (31 транскрипт) в одній великій групі для П/А стратифікації. У табл. 3.76 показані набори генів та їх статистичні параметри для кращих варіантів комбінаторного аналізу.

Можна відмітити, що набір з 6-и генів (*CDH2, KRT18, PCA3, HOTAIR, ESRI, IL1R1*) має найвищі статистичні параметри і складається з генів з різних досліджуваних груп.

У експресійних панелях більше 7 генів в наборі статистичні параметри (точність, чутливість, Odds Ratio) починають зменшуватися в порівнянні з

Таблиця 3.76.

Набори біомаркерів з загальної групи генів з найвищими статистичними параметрами

Набори генів	Статистичні параметри
<i>PCA3, HOTAIR, ESRI, IL1R1</i>	Accuracy: 0.9298 Sensitivity: 0.973 Specificity: 0.85 Odds Ratio:204.0 χ^2 : 40.695 (p < 0.0001)
<i>MMP9, PCA3, HOTAIR, ESRI, IL1R1</i>	Accuracy: 0.9298 Sensitivity: 0.973 Specificity: 0.85 Odds Ratio:204.0 χ^2 : 40.695 (p < 0.0001)
<i>CDH2, KRT18, PCA3, HOTAIR, ESRI, IL1R1</i>	Accuracy: 0.9298 Sensitivity: 1.0 Specificity: 0.8 Odds Ratio: ∞ χ^2 : 41.1512 (p < 0.0001)

наборами з 4-6 генів. Крім того, збільшення кількості генів в наборі надмірно ускладнює інтерпретацію результатів (правила якщо-то) і витрати на потенційний аналіз.

Аналогічний MDR аналіз 31 транскрипта ми провели для 37 аденокарцином з різними стадіями (П 1-2 стадія і П 3-4 стадія) і СГ (П СГ \leq 7 і П СГ > 7) для стратифікації цих груп.

Узагальнюючи наші експериментальні дані, ми можемо запропонувати набір з 12 генів: *CDH2, CXCL12, CCL17, ESRI, FN1, IL1R1, HIF1A, HOTAIR, KRT18, PCA3, S100A4, VDR* для стратифікації аденокарцином від аденом і розрізнення аденокарцином за їх стадією (1-2 і 3-4 стадії) і сумою за шкалою Глісона (СГ \leq 7 і СГ > 7). Ці дані представлені в табл. 3.77 [907].

Цей комплексний набір включає 3 сети для стратифікації. Кожен з них має свої статистичні параметри. Найвищі параметри(Ас, Se) має П/А набір біомаркерів. У той час як аденокарциноми з різними СГ мають найнижчі статистичні параметри (Ас і Sp). Цей факт можна пояснити гетерогенними

Таблиця 3.77.

Експресійний набір з 12 біомаркерів для виявлення аденокарцином та розрізнення П/А і П з різними стадіями і СГ пухлин ПЗ

Застосування	Набір маркерів	Статистичні параметри набору
Виявлення та розрізнення П/А	<i>CDH2, KRT18, PCA3, HOTAIR, ESRI, IL1R1</i>	Accuracy: 0,9298 Sensitivity: 1,0 Specificity: 0,8 Odds Ratio :>200 χ^2 : 41,1512 (p < 0,0001)
Розрізнення П 1-2 стадія та П 3-4 стадія	<i>CDH2, CXCL12, HIF1A, S100A4</i>	Accuracy: 0,9189 Sensitivity: 1,0 Specificity: 0,8929 Odds Ratio::>200 χ^2 : 24,7768 (p < 0,0001)
Розрізнення П СГ ≤ 7 та П СГ >7	<i>FN1, VDR, CCL17, IL1R1</i>	Accuracy: 0,8108 Sensitivity: 1,0 Specificity: 0,65 Odds Ratio::>200 χ^2 : 17,0354 (p < 0,0001)

рівнями ВЕ генів у пухлинах з СГ = 7 (що входять до групи П СГ ≤ 7), як ми показали раніше [730, 779]. Проте ця підгрупа в наборі все ж має досить високі статистичні параметри, які відповідають хорошему діагностичному рівневі.

Отримані нами результати з молекулярного профілювання на основі даних ВЕ генів дають можливість додати перелік генів до запропонованого набору з 12 експресійних біомаркерів, або зробити додатковий набір для профілювання та встановлення чутливості до деяких препаратів (гени з переліку потенційних фармакологічних маркерів). Тоді діагностично-профілюючий набір буде мати наступний вигляд:

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

2 частина набору - Молекулярне профілювання раку ПЗ:

а) Розрізнення підтипів раку ПЗ за характеристиками 19 маркерів пухлинних клітин: *AR Isof, TMPRSS2-ERG, CDH1, CDH2, NKX3-1, KRT18, PSA, OCLN,*

PCA3, MMP2, SCHLAP1, ESRI, INSRA, INSRB, IGF1R, PRLR, PRL, VDR, SRD5A2

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

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

Жирним відмічено гени, які вже зустрічались і попередніх групах. Загалом повний експресійний набір для діагностики та молекулярного профілювання раку ПЗ складається з 45 генів, з яких до 12 генів діагностичної частини набору додається 33 нових гени для встановлення підтипів раку ПЗ та фармакологічних біомаркерів.

Отже, за результатами NotI-мікропанелей запропоновано потенційні діагностичні набори для виявлення та розрізнення пухлин яєчника, яка складається з 12 маркерів та пухлин передміхурової залози, яка складається з 16 маркерів з високими статистичними показниками.

Базуючись на даних рівнів ВЕ низки генів-мішеней терапевтичних препаратів виявлено потенційні діапазони чутливості до препаратів, що може бути використано для встановлення ефективності препаратів у персоналізованій медицині та розробки схем лікування хворих.

Розроблено алгоритм й проведено оптимізацію MDR аналізу для підбору експресійних панелей та запропоновано набір з 12 експресійних біомаркерів для виявлення та розрізнення аденокарцином ПЗ.

Роботи, які опубліковано за результати цього підрозділу: [552, 554, 879, 880, 907].

РОЗДІЛ IV

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В останні роки активно розвиваються технології широкомасштабного скринінгу геномних, епігеномних, транскриптомних порушень при різних захворюваннях людини методами секвенування нового покоління, мікрочипів та міропанелей [8, 9, 505, 509]. Але поки не існує такої унікальної технології, як NotI-мікропанелі, яка дозволяє одночасне виявлення як генетичних, так і епігенетичних змін при певній патології, адже це різні шляхи порушення експресії генів, аберації у яких можуть відбуватись або на одному на генетичному рівні, чи на епігенетичному рівні, або охоплювати обидва рівні регуляції експресії генів.

Групи Е. Забаровського і В. Кашуби досліджували генетичні та/або епігенетичні зміни в пухлинах людини широкомасштабним методом NotI-мікропанелей протягом більше п'ятнадцяти років. Цей метод технологією порівняльної гібридизації (Міжнародний патент Karolinska WO 02/0816163 і PCT / SE02 / 00788), заснований на гібридизації NotI-зв'язаних бібліотек, отриманих з пухлин і нормальної геномної ДНК [313, 549, 558]. Це дозволяє визначити як генетичні (делеції, ампліфікації), так і епігенетичні (метилування, деметилування) зміни геномної ДНК NotI-пов'язаних генів / локусів, внаслідок чутливості ферменту рестрикції NotI до статусу метилування CpG острівців. Використовуючи цю технологію, у більш ніж 250 зразках злоякісної пухлини, отриманих з різних органів і тканин, проаналізовано 180 NotI-зв'язуючих клонів з різних областей 3-ої хромосоми людини [29, 30, 314]. У дисертації наведено результати гібридизацій на NotI-мікропанелей для 4-х з семи локалізацій епітелійних пухлин [551-553, 554, 555], для яких проведено ці дослідження та узагальнено дані по семи локалізаціям епітелійних пухлин [555]. Відомо, що

генетичні та епігенетичні порушення 3-ої хромосоми мають дуже важливий вплив на канцерогенез різних видів раку людини [19-22]. На 3-ій хромосомі розташовані кілька відомих і потенційних генів супресорів пухлин, а також багато генів асоційованих з раком [23, 27]. Область 3p25-p26 містить-відомий ген-супресор *VHL*; 3p12-p14.2 область містить ген-супресор *FHIT*; 3p24 має ген *RARB*, а область 3p21-p22 включає ген *RASSF1A* [286, 287]. Однак функція і роль багатьох інших генів 3-ої хромосоми, які виявляють зміни у різних типах раку людини, була значною мірою невідомою до дослідження NotI-мікропанелей.

Так, у пухлинах яєчника з використанням NotI-мікропанелей нами виявлено більше тридцяти генів та/або локусів, зміни в яких (делеції та/або метилювання) перевищують 17-30% [552]. За даними літератури та результатами наших досліджень, деякі гени та/або локуси зазнають аберацій чи змінюють рівень експресії в багатьох видах епітелійних пухлин і лейкеміях. Раніше інші автори відмічали аберації та зміни рівня експресії, метилювання та генетичні порушення при різних типах раку і інших патологіях для 16 з цих генів та/або локусів, що свідчить про важливість для канцерогенезу досліджуваних ділянок 3-ої хромосоми. Друга цікава група генів та/або локусів – це ті, для яких вперше визначено генетичні та/або епігенетичні порушення. Функціональний спектр білків зазначених генів досить різноманітний. Серед них є гени, що кодують фактори транскрипції (*GATA2*, *MITF*, *SOX2*, *FOXP3*), рецептори різних гормонів і метаболітів (*RARB*, *THRB*, *PAQR9*), білки, що беруть участь в процесі убіквітинування (*UBE2E2*, *VHL*, *SIAH2*) та в різних сигнальних шляхах клітини. Відомо, зокрема, що *GATA2* взаємодіє з сигнальним шляхом ретиноїдної кислоти [560], до якого причетний. Він має зміни експресії при раку яєчника у нашому дослідженні, як і ген *RARB*. Функції деяких генів та/або локусів (із змінами більше 30%) поки ще не відомі, серед них *hmm210782*, *LOC285205*, *hmm144092*. Встановлено, що ген *ZIC4* разом з *GATA2* має метильовані CpG островці при раку сечового міхура; що пов'язують з високим ступенем прогресування та інвазивним характером пухлин сечового

міхура [560]. Варто зазначити, що лише для гена *GNAI2* відмічено зміну експресії при раку яєчника іншими методами, зокрема SAGE та кПЛІП [908, 909]. За допомогою NotI-мікропанелей виявлено аналогічні аберантні гени та/або локуси із змінами в пухлинах яєчника та при раку шийки матки (*RARB*, *BHLHB2*, *ITGA9*) [31] і раку нирки (*NKIRAS1*, *GNAI2*, *FOXP3*, *MINT24*) [30].

Для раку кишечника виявлено 27 генів та/або локусів з генетичними та/або епігенетичними абераціями. Лише шість з них раніше були описані як ті, що залучені до розвитку раку кишечника [553]. Зміни 19 генів та/або локусів раніше були невідомі для цього виду раку. Роль 10 генів та/або локусів у карциногенезі ще не була відмічена. Білки, що кодуються п'ятьма генами, які виявили високий відсоток аберацій в зразках раку кишечника, беруть участь у важливих сигнальних шляхах, при розвитку цього виду раку. До них відносяться ген *WNT7A* (сигнальний шлях WNT / β -катенін), ген *VHL* (шлях HIF), ген *FOXP1* (шляхи естрогена та HIF), ген *RARB* (опосередковує ретиноїдні шляхи, які впливають на клітинний ріст і диференціацію), і ген *LRRC3B* (бере участь в репарації ДНК).

Порівняльний аналіз результатів NotI-мікропанелей між різними локалізаціями раку показав, що найвища кількість спільних змін генів та/або локусів на 3-ій хромосомі виявлена для раку кишечника та яєчника. Ми припускаємо, що ці види раку проявляють подібні генетичні та/або епігенетичні зміни під час свого розвитку [551, 553].

Найбільша кількість генів та/або локусів з генетичними/епігенетичними змінами виявлено для раку передміхурової залози – 50 генів та/або локусів, для яких як і для інших локалізацій епітелійних пухлин найчастіші зміни 3-ої хромосоми гетерозиготні делеції та/або метилювання [554, 555]. Як і для пухлин молочної залози, всі гени / локуси з найбільшим відсотком гени та/або локуси зі змінами при раку передміхурової залози згідно результатам бази даних PubMed. Зміни можна розділити на три групи: (1) раніше не показано, що вони пов'язані з канцерогенезом. Серед них гени та/або локуси: *HMGB1L5*, *LRRC58*, *GPR149*, *DZIP1L*, *C3orf77*, *NUDT16*; (2) вже відомо, що порушення

генів залучені до різних видів раку, наприклад: *BHLHE40*, *BCL6*, *PLCL2*, *ITGA9*, *CTDSPL (RBSP3)*, *GORASP1 / TTC21A*, *FSTL1*, *IQSEC1*, *CLASP2*, *GNAI2*, *SOX2*, *MINA*, *WNT7A*, *FGF12*, *SOX14*, *ZIC4*, *RAP2B*, *FGD5*, *CMTM8*, *LRRC3B*; (3) раніше показано зміни, що асоціюється з раком ПЗ: *FOXP1*, *MANF*, *GATA2*, *ALDH1L1*, *EPHB3* [554].

Слід зазначити, що зміни багатьох генів (*ITGA9*, *LRRC3B*, *FGF12*, *GORASP1*, *NKIRAS1*, *CTDSPL (RBSP3)*, *GATA2*, *SEMA3B*, *IQSEC1*, *PPM1M1*, *PRICKLE2*, *BHLHE40* та ін.), які були виявлені за допомогою NotI-мікропанелей, порушення були підтверджені іншими методами, такими як ЛОН, МСП, бісульфитне секвенування, аналіз делецій та дослідження експресії як нами, так і іншими дослідниками [32, 33, 10-18]. Пухлино-супресорна функція для низки генів була підтверджена в модельних системах (клітинні лінії, експериментальні тварини), використовуючи транзиторну і конститутивну експресію цих генів [29, 315].

Крім того, ми досліджували генетичні та/або епігенетичні зміни і експресію деяких генів, які не мають NotI-сайту (*GPX1* і *SEMA3B*), але знаходяться у відомій області LUCA (3p21.3) де розташовані відомі гени-супресори, як *RASSF1A* 3p21.31. В цьому локусі нами виявлено в низці пухлин аберації генів *NBEAL2*, *GNAI2*, *NPRL2*, *TOPAZ1* (3p21.31). Наше дослідження підтвердило генетичні та/або епігенетичні зміни і втрати експресії для генів *GPX1* і *SEMA3B* при раку нирки і легені [579, 580, 583].

Крім того, відомо, що ген *SEMA3B* може мати як пухлинно-супресивні, так і проінвазивні властивості. Повідомлялося, що експресія білка *SEMA3B* різко знижується в клітинній лінії H460-M, отриманої з клітинної лінії NIH-H460 пухлини великих клітин, яка індукує спонтанні метастази у мишей [910]. З іншого боку, він дуже високо експресується у багатьох інвазивних і метастатичних ракових захворюваннях людини; наприклад, колоректальний рак, нейробластома, меланома та гостра мієлоїдна лейкемія [575, 911]. Ген *SEMA3B* індукує апоптоз і продукування інтерлейкіну 8 пухлинними клітинами шляхом ініціювання шляху протеїнкінази, активованої р38-митогеном. У свою

чергу, вивільнення інтерлейкіну 8 індукує появу пухлино-асоційованих макрофагів, що може призвести до метастатичного поширення пухлини [575, 912]. Семафорини 3 кодують білки з аксональними властивостями, які в цілому впливають на рухливість і міграцію пухлинних і ендотеліальних клітин шляхом індукції колапсу актинового цитоскелету за допомогою зв'язування з нейропілінами / комплексами плексинів [913]. Раніше семафорини класу 3 були причетні до прогресії пухлини та метастазування [910, 914]. Однак властивості супресії пухлини різних семафоринів відрізняються в різних типах раку. Семафорини 3 були запропоновані як потенційні інгібітори ангиогенезу для лікування потрійного негативного лікування раку молочної залози [915]. Однак Варшавський та ін. визначили, що точкові мутації на сайті розщеплення *SEMA3B* можуть інгібувати ангиогенез *in vitro* та *in vivo* [916]. Дослідниками продемонстровано, що примусова експресія *SEMA3B*, але не *SEMA3F*, інгібувала життєздатність клітин раку яєчника *in vitro*. Експресія гена *SEMA3F*, але не *SEMA3B*, значно інгібувала продукцію ендотеліальних трубок, сформованих ендотелійними клітинами пуповинної вени людини (HUVEC) *in vitro* [917].

У нашому дослідженні, використовуючи PI-FACS, ми показали, що пригнічення росту пухлини при експресії гена *SEMA3B* пов'язане з індукцією апоптозу *in vitro* [589]. Крім того, ми припустили, що ген *SEMA3B* здатний індукувати апоптоз і, можливо, пригнічувати ангиогенез *in vivo*, який раніше демонструвався тільки *in vitro* [575]. Однією з ознак генів-супресорів є знижена регуляція їх експресії в різних пухлинах на рівні РНК або білка. Інактивація гена-супресора в пухлинах може бути викликана метилюванням промоторної ділянки. Гіперметилювання промоторів знижує рівні мРНК не тільки гена *SEMA3B*, але і деяких інших генів LUCA-регіону в пухлинах; наприклад, *RASSF1A*, *BLU* і *CACNA2D2* [281, 298, 308]. Метилювання гена *SEMA3B* спостерігається в різних типах раку, включаючи рак легені, печінки, жовчного міхура, шлунка, молочної залози і нейробластоми [918-921]. Проте ці дослідження включали лише CpG-острівці, який, згідно з базою даних NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), належить до першого інтрона (+1350 .. + 1700 bp від SEMA3B). 5'-кінець гена *SEMA3B*. Однак існує справжня промоторна область, яка включає CpG-динуклеотиди з більш високою щільністю (-300 .. + 50 bp від SEMA3B 5'-кінця) і здатні зв'язувати транскрипційні фактори, такі як Lyf – 1, DeltaEF – 1, Tcf – 11, c – Myb, SP1, C / EBP та AhR / Arnt (відповідно до останніх даних ENCODE). Нами проаналізовано метилювання як інтронних, так і промоторних CpG-острівців в ракових клітинних лініях легенів і нирки і репрезентативних наборах первинних пухлин [589]. Ми спостерігали підвищення метилювання інтронних і промоторних CpG-острівців як в пухлинах легені, так і в первинних пухлинах нирки. Крім того, метилювання промоторного CpG-острівця, було вищим, ніж у інтроніному острівці в досліджуваних пухлинах (44–52% проти 32–39%). Таким чином, метилювання як промотору, так і інтронних CpG-острівців гена *SEMA3B* є ознакою пухлин легені і нирки.

Крім того, спостерігалася асоціація між зниженням рівня мРНК гена *SEMA3B* і метилюванням промоторного і інтронного CpG-острівців в первинних пухлинах раку нирки (коефіцієнт кореляції Спірмена дорівнював 0,50 ($p < 0,01$) для промоторного CpG-острівця і 0,25 ($p < 0,01$) для інтронного острівця). Ці дані означають основний внесок метилювання промоторного CpG-острівця у зниження експресії гена-супресора *SEMA3B*.

У нашому дослідженні підтверджено пухлинно-супресивну активність *SEMA3B* як *in vitro* (клітини U2020 мілкоклітинного раку легені), так і *in vivo* (модель імунодефіцитних (SCID) мишей), як за допомогою аналізу росту пухлин та імуногістохімічного аналізу [589]. Попередні дослідження в клітинній лінії ADC клітин молочної залози та яєчника свідчили про пухлинно-супресивну активність гена [586], однак у нашому дослідженні вперше показано пригнічувальний ефект на ріст пухлин експресії гена *SEMA3B in vivo* шляхом індукції апоптозу або, можливо, інгібування ангиогенезу [589]. Розуміння ролі родини білків SEMA3 у канцерогенезі, у тому числі SEMA3B,

допоможе використовувати їх пухлинні супресивні та антиангіогенні властивості для розвитку нових засобів для терапії раку в майбутньому.

Порівняльний аналіз NotI-мікропанелей показав значні зміни (делеція або метилювання) у 74 генах та/або локусах для семи різних епітелійних раках, а саме кишечника, яєчника, нирки, легені, молочної залози, шийки матки і передміхурової залози [555]. Виявлено 40 генів та/або локусів із змінами з 3p плеча і 34 генів / локусів з 3q плеча 3-ої хромосоми. П'ять генів з області 3p14-3p24 (*FOXP1*, *LRRC3B*, *NKIRAS1*, *RBSP3*, *ZIC4*) були змінені у всіх типах раку. Для п'ятнадцяти генів делеція та/або метилювання виявлені у більшості пухлин, серед них гени *ITGA9*, *GORASP1*, *IQSEC1*, *CGGBP1*, *NBEAL2* і *VHL* локалізовані в області 3p12-3p26; гени *PPP2R3A*, *FGF12*, *ALDH1L1*, *GATA2* і *PLCL2*, що локалізовані на 3q13-3q28. Дані інших дослідників виявили зниження експресії генів *HYAL1*, *HYAL2*, *RASSF1A* (область 3p21.31) при недрібноклітинному раку легені [922]. Ці дані свідчать про множинну інактивацию генів-супресорів і наявність потенційних кластерів генів-супресорів у 3-ій хромосомі людини.

Двадцять два гени з 74 досліджених виявили делеції та/або метилювання, специфічні для одного типу пухлин. Найбільше число - 13 генів та/або локусів виявлено для раку передміхурової залози. Це вказує на специфічні механізми розвитку раку передміхурової залози [555].

Наші результати підтверджують ефективність методу NotI-мікропанелей для широкомасштабного скринінгу генетичних та епігенетичних змін геному в епітелійних пухлинах. Цей новий метод повинен привести до відкриття нових генів-супресорів пухлин і може призвести до розроблення набору маркерів для ранньої діагностики та прогнозу перебігу захворювання [554, 584, 879, 880].

Крім того підтвердження наявності метилювання генів у епітелійних пухлинах, яке відбувається на ранніх етапах канцерогенезу [187, 195, 225], може бути використано для створення неінвазивних методів ранньої діагностики у біологічних рідинах, таких як кров та сеча [303, 500, 573].

Враховуючи отримані результати NotI-мікропанелей та дані літератури стосовно гетерогенності та особливостей канцерогенезу пухлин передміхурової залози ми провели дослідження особливостей експресії генів, пов'язаних з цими процесами, що відносяться до різних етапів розвитку пухлин як на модельних системах – клітинних лініях, так і на зразках пухлин ПЗ. Крім того ми звернули увагу на пошук особливостей пухлино-стромальних взаємодій та їх взаємовпливів при прогресуванні пухлин передміхурової залози для виявлення молекулярних підтипів і панелей біомаркерів для діагностики цього виду раку [43, 49, 365, 612, 783, 839].

Для пошуку диференційно-експресованих генів, які можуть дати уяву та допомогти у розкритті специфічних механізмів надбання агресивності та втрати чутливості до андрогенів, підвищення агресивності та метастатичного потенціалу пухлин ПЗ ми вивчили спочатку рівні BE 65 пухлино-асоційованих генів у трьох клітинних лініях раку ПЗ LNCaP, DU145 та PC3 у порівнянні з клітинною лінією умовно-нормальної клітинної лінії PNT2 [619, 640]. Із проведеного аналізу експресії генів знайдено зміни експресії для 29 генів у клітинній лінії LNCaP, для 20 генів – у клітинній лінії DU145 та для 16 генів – у клітинній лінії PC3. У клітинній лінії LNCaP простежується інгібування класичного Wnt-шляху. У клітинних лініях LNCaP та PC3 виявлено інгібування p53-опосередкованого апоптозу. Зниження експресії гена *SEMA3A* може свідчити про активізацію сигнальних шляхів, контролюючих міграцію клітин. В усіх лініях раку ПЗ простежується активація ЕМП, який виявляється в зниженні рівня експресії генів клітинної адгезії (*CDH1*, *CSPG4*, *EFNA5*, *FYN*) та епітелійного маркера *CDH1*. Також у клітинних лініях раку простати простежується активація сигнальних шляхів, відповідальних за інвазивність, метастазування та ангиогенезу. Підтвердженням цього може бути підвищення рівня експресії генів *S100A4*, *IL8* та зниження рівня експресії генів-інгібіторів серпінових пептидаз (*SERPINE1*, *SERPINE2a*, *SERPINE2b*) [624, 626, 635].

Таким чином, основними процесами, що зазнають найбільших змін експресії генів, протягом переходу від неагресивних до агресивних типів раку

простати, змодельованому на клітинних лініях, є адгезія клітин, інвазивність та метастазування. За цими даними нами відібрано низку генів, експресія яких відрізняється в андроген-чутливих та андроген- нечутливих клітинних лініях, які потребують підтвердження із застосуванням інших методів як на рівні мРНК, так і на рівні протеїну, та можуть бути використані для подальшої розробки діагностичних панелей інвазивних та метастазуючих пухлин ПЗ.

Спираючись на ці результати ми провели ще одне дослідження пошуку диференційно-експресованих генів між андроген-чутливою клітинною лінією LNCaP та андроген-незалежною клітинною лінією з високим метастатичним потенціалом PC3 для пошуку генів та механізмів, що приймають участь та мають вплив на цей патологічний процес [639, 640]. Порівняння експресії 84 генів у клітинній лінії PC3 відносно лінії LNCaP показало зміни BE 36 генів. Серед генів контролю клітинного циклу і репарації ДНК, а також генів сигнальної трансдукції і транскрипційних факторів зафіксовано зниження експресії генів, здатних інгібувати ріст пухлин (*TP53*, *BRCA1*, *FOS*, *NFRBIA*, *SNCG*). Серед генів, які відповідають за апоптоз і клітинне старіння виявлено значне підвищення експресії анти-апоптичних генів (*BCL2*, *BCL2L1*). Крім того, спостерігається підвищення експресії про-апоптичних генів (*BAX*, *CASP8*), що може свідчити про переважаючі процеси інгібування апоптозу в клітинах PC3 [641-644]. Також відмічено підвищення експресії генів ангіогенезу (*PDGF*, *TGFB1*, *THBS1*, *VEGFA*) та інвазивності і метастазування (*MET*, *MTA2*, *MMP1*, *PLAU*, *NMEU*), що підтверджує підвищення агресивності клітинної лінії PC3 [652-655, 656-658]. Особливу увагу привертають 14 диференційно-експресованих генів, серед яких два гени з групи апоптозу і клітинного старіння (*BCL2*, *BCL2L1*), два гени з групи сигнальної трансдукції і транскрипційних факторів (*PIK3R1*, *FOS*), два гени адгезії (*ITGA3*, *EPDR1*), два гени ангіогенезу (*TGFB1*, *VEGFA*), шість генів зі шляхів інвазивності і метастазування (*MET*, *MMP1*, *MTA2*, *NME4*, *PLAU*, *SERPINE1*). Сім з цих генів мають білки, що секретуються, і можуть в подальшому розглядатися як

маркери агресивності і метастазування на рівні білка у біологічних рідинах (*MET, MMP1, PLAU, SERPINE1, EPDR1, TGFB1, VEGFA*) [639].

За результатами обох досліджень на клітинних лініях відібрано 7 диференційно-експресованих генів для вивчення рівнів ВЕ у зразках пухлин ПЗ: *TAGLN, EFNA5, IL1B, PLAU, TGFB1, EPDR1, FOS*. Отримані дані ВЕ генів показали високий рівень дисперсії значень в усіх досліджуваних групах аденокарцином, УНТ та аденом [671, 672]. Це може бути наслідком генетичної гетерогенності як у пухлинах, так і в умовно-нормальних зразках ПЗ, а також результатом диференційної регуляції при різних умовах розвитку пухлин та функціонування тканини ПЗ, серед яких індивідуальний гормональний рівень людини [147, 148, 203]. Ще фактором, який впливає на рівень дисперсії може бути експресія генів у різних типах клітин [599, 600, 777]. Але цей вплив можна охарактеризувати завдяки співставленню з іншими методами дослідження на рівні білка – імуногістохімічні дослідження, та встановленням кореляцій між експресією досліджуваних генів та генів-маркерів інших типів клітин, що входять в склад пухлин: епітелійних, ракових, різних типів клітин стромы, що нами й зроблено [849]. Крім того на дисперсію експресії у загальній групі аденокарцином може впливати СГ пухлин та стадія захворювання, як і можливі молекулярні підтипи раку ПЗ [720, 730]. Як описано в результатах дослідження, з цих семи генів диференційну експресію у зразках аденокарцином у порівнянні з аденомами та УНТ виявлено для *FOS, EFNA, IL1B*.

Дослідження співставлення результатів ВЕ генів *EFNA5, EPDR1, FOS, IL1B, PLAU, TAGLN* і *TGFB1* та імуногістохімічного аналізу їх білків й кореляцій ВЕ з пухлинними та стромальними маркерами показав, що сигнал білка *TGFB1* зменшується при прогресії пухлини. Аналіз кПЛР показав високі рівні дисперсії значень РЕ. Засоби мінімуму і максимуму були розкидані понад 100 разів. Звичайно, білок *TGFB1* експресується в різних клітинах. Тому ми не виявили значних змін ВЕ гена *TGFB1* між групами пухлин ПЗ. Ген *IL1B* аналогічно експресувався у всіх пухлинах. Ймовірно, це пов'язано з тим, що він

експресується головним чином гемопоетичними клітинами. Використовуючи кПЛР, неможливо розрізнати типи клітин.

Гени *FOS*, *PLAU* та *EPDR1* показують залежність BE від стадії пухлини, СГ і наявності або відсутності ГТ *TMPRSS2-ERG*. Ці три гени демонструють диференційну експресію в двох підтипах аденокарцином, як показано за допомогою кластерного аналізу. Білки FOS і PLAU експресуються в клітинах раку передміхурової залози. Сигнал білка FOS був вище в аденокарциномах порівняно з гіперплазією. Така ж тенденція була продемонстрована за допомогою кПЛР, коли аденокарциноми порівнювали з аденомами [849].

Узгодження даних експресії на різних рівнях (мРНК і білок) з використанням різних статистичних методів дозволяє зрозуміти і візуалізувати неоднозначні результати експресії досліджуваних генів у зразках раку ПЗ.

Отже, клітинні лінії раку передміхурової залози є вдалою моделлю для вивчення функцій генів у ракових клітинах, але якщо гени експресуються не тільки в клітинах пухлин, а й інших типах, наприклад фіброблестах, макрофагах, імунних клітинах, ендотеліальних, тощо, то результати вивчення експресії і впливу на процес канцерогенезу буде не адекватним. Тобто кожне завдання потребує вірного підбору моделей для дослідження та адекватної реалізації намічених цілей та завдань.

Для виявлення особливостей експресії генів-маркерів пухлинних клітин та елементів строми раку ПЗ ми провели встановлення та аналіз рівнів відносної експресії відібраних генів-маркерів у аденокарциномах ПЗ, парних умовно-нормальних тканинах та аденомах. Відомо, що для канцерогенезу передміхурової залози характерні певні порушення, серед яких утворення гібридних транскриптів андроген-регульованих генів з протоонкогенами та іншими пухлино-асоційованими генами, які мають стимулюючий вплив на ріст пухлин [170, 519, 684, 687]. Ці порушення відрізняються у різних популяціях, тому нам було актуально визначити які саме гібридні транскрипти утворюються у хворих з української популяції. З семи варіантів ГТ ми виявили один ГТ *TMPRSS2-ERG*. Ізоформа 2 ГТ *TMPRSS2-ERG* (EF194202.1) вперше

була виявлена в зразках пухлини передміхурової залози Lapointe J., et al. [696]. Відомо, що формування цього ГТ призводить до над експресії онкогенного білка ERG [695], який бере участь у сигнальних шляхах, пов'язаних з розвитком раку ПЗ та процесах ЕМП [646, 701]. Наші результати показали, що ГТ *TMPRSS2-ERG* присутній на ранніх стадіях розвитку раку, а рівень його експресії значно збільшується у групі з високим СГ. Добре відомо, що ERG бере участь у сигнальному шляху Wnt, який регулює транскрипцію генів, проліферацію клітин і міграцію клітин [646]. Є докази того, що одна з його ізоформ здатна продукувати химерний білок, який здатний регулювати активність рецептора інсуліноподібного фактору росту-1 [726]. Вона відіграє ключову роль у рості клітин і пухлинній патології, а в більшості злякисних новоутворень, включаючи рак ПЗ, і сигнальний шлях IGF1, важливу мережу виживання клітин, є надлишковою. Транс-активація гена IGF1R онкогеном ERG є ключовою подією в розвитку раку передміхурової залози. Посилена активація надмірно експресованого IGF1R локально продукованим або циркулюючим IGF1 або IGF2 може забезпечити селективну перевагу пухлинним клітинам [700]. Крім того, наші дані свідчать про формування цього транскрипта на ранніх стадіях карциногенезу ПЗ. Надалі вона може бути використана при розробці методу ранньої діагностики та прогнозування перебігу захворювання з урахуванням даних, отриманих в інших дослідженнях [692, 869]. Недавні дослідження демонструють зв'язок між експресією андрогенних рецепторів і експресією ГТ *TMPRSS2-ERG* при раку ПЗ, що дає аргументи на користь того, що експресія цього транскрипта синтезу залежить від впливу андрогенів у гормонально-залежному стані пухлини [685, 694, 735]. Відомо також, що експресія ГТ *TMPRSS2-ERG* корелює з такими сигнальними шляхами, як RAS / RAF і PI3K / PTEN / AKT [690, 692].

Для багатьох типів пухлин ЕМП є важливим процесом у прогресуванні та метастазуванні раку. Він має певні особливості у різних типах пухлин [412, 684]. Відомо, що підвищення експресії мезенхімних маркерів і зниження експресії епітелійного маркера є ознакою прогресування пухлини, інвазивності

та метастазування, що свідчить, як правило, про агресивність пухлини і поганий прогноз захворювання [683, 687]. Кожен зразок тканини містить крім клітин пухлин також нормальні епітелійні клітини, різні типи імунних клітин, стромальні компоненти (фібробласти, макрофаги, ендотелійні клітини) тощо [42, 810]. Тому важливим завданням є визначення патернів експресії досліджуваних генів у конкретних типах клітин, щоб зрозуміти природу змін.

Результати наших досліджень показали, що рівні BE більшості генів часто є гетерогенними, особливо в групі аденокарцином ПЗ [720, 730, 754, 779], що не дає можливості виявити значущі відмінності BE між досліджуваними групами пухлин. Ймовірно, звичайне групування не відображало неоднорідність вибірки, а також стадію, тип, різні фактори канцерогенезу і молекулярну характеристику типів і підтипів раку передміхурової залози [204, 852]. Відмінності BE більше, ніж 10-20 разів в одній групі дозволили нам припустити, спираючись на дані літератури, що є зразки з обома, низькими і високими рівнями експресії, а також з незміненими рівнями BE, які насправді можуть належати до різних молекулярних підтипів пухлин [720, 730]. Щоб зрозуміти природу цих варіацій, необхідно визначити причинно-наслідкові канцерогенні фактори і молекулярні процеси й визначити ознаки, за якими можливе розділення на ці підтипи.

Вивчення впливу виявленого ГТ *TMPRSS2-ERG* на експресію деяких генів рецепторів, ензимів і генів, асоційованих з раком ПЗ показало наявність низки змін BE генів. В парних зразках П/УНТ виявлено специфічні зміни BE у раку ПЗ з ГТ для 5 генів, тоді як зміни BE для пухлин без злиття були знайдені тільки для 2 генів. Високий рівень BE гена *ESR1* в пухлинах, де виявлено ГТ, може бути пов'язано з більш швидким прогресуванням раку [727, 731].

У нашій роботі серед аденокарцином, УНТ і аденом ми виявили, що гени *ESR1* і *SRD5A2* демонструють змінені рівні BE незважаючи на наявність ГТ *TMPRSS2-ERG*, тоді як гени *AR*, *MMP9* та *HOTAIR* мають зміни BE лише у зразках без ГТ, а експресія генів *KRT18*, *PCA3* та *SCHLAP1* мала значущі відмінності в аденокарциномах зі ЗТ. Слід зазначити, що в аденомах ми

виявили найвищі рівні BE гена *SRD5A2*. Відомо, що підвищення експресії гена *SRD5A2* в аденомах провокує активацію росту гіперплазії через шляхи NF- κ B і AR-ізоформу 7, що пригнічує інгібітори 5 α -редуктази [736]. З іншого боку, зниження рівня BE гена *SRD5A2* в П пов'язано з посиленою міграцією і метастазуванням клітин [923]. Крім того, при відновленні експресії гена *SRD5A2* міграція та інвазія клітин пригнічувалась внаслідок реорганізації F-актину [924].

Стосовно некодувальних РНК відомо, що високий рівень BE lncRNA *SCHLAP1* в П зі ГТ передбачають несприятливий прогноз захворювання [925]. Інша lncRNA *HOTAIR*, коли вона є надекспресованою в аденокарциномах без ГТ, це посилює проліферацію і інвазію на пізніх стадіях раку ПЗ [874].

Як ми вже згадували вище, зміни в метаболізмі ліпідів є однією з ознак канцерогенезу [360, 362]. За останні роки зроблено багато зусиль для розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі впливу ліпідного обміну на лікування раку. Багато білків, що беруть участь у метаболізмі ліпідів, є потенційними мішенями для протиракової терапії. Деякі препарати з протизапальними та імуномодулюючими ефектами, які схвалені FDA для неракових захворювань, демонструють протираковий ефект [890, 891]. Наприклад, Cerulenin, Orlistat, C75, Triclosan і EGCG, які були розроблені як інгібітори ензиму FASN, зараз знаходяться в доклінічних випробуваннях для солідних пухлин [896, 897, 926, 927]. Більш того, Орлістат вже продемонстрував ефективність лікування раку передміхурової залози [897].

Інша група широко відомих препаратів - статини, тестуються для лікування раку. Ці сполуки є інгібіторами 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктази (HMGCR) [370], і вони знаходяться в клінічних випробуваннях. Один зі статинів, Симвастатин [740], знаходиться зараз на доклінічній стадії тестування для лікування раку передміхурової залози [892]. Звертає на себе увагу, що LDLR може бути мішенню для доставки протиракових лікарських засобів [928]. Інгібітори білка СРТ1 Етомоксир, а також Ранолазин і ST1326 знаходяться в клінічних випробуваннях для лікування раку простати і лейкемії

відповідно [929, 930, 931 25, 26, 27]. Целекоксиб, інгібітор білка COX-2, відомий як препарат, спрямований на ліпідні медіатори пухлино-стромальної взаємодії, використовується в клінічних дослідженнях для лікування раку молочної залози [681].

У нашій роботі встановлено високі рівні гетерогенності у BE всіх досліджуваних генів, особливо у зразках пухлин ПЗ, як і для багатьох інших досліджуваних генів. Отже, можливо, що пухлини можуть мати різну чутливість до лікарських засобів, незважаючи на те, що вони знаходяться в одній групі, мають однакові стадії розвитку пухлин або СГ. Отже, важливо виявити перелік генів і порогові рівні BE, коли раки будуть найбільш ефективно реагувати на медикаментозне лікування [894, 929].

Виявлено, що тільки гени *FASN* і *COX2* мали підвищену експресію в загальній групі аденокарцином в порівнянні з аденомами. Заслуговує на увагу, що рівні BE гена *COX2* також були підвищені в групі УНТ, що може бути показником запалення в ПЗ [748, 749]. Статистичний аналіз груп П з різними стадіями і СГ показав збільшення BE тільки в П на стадії 1-2 і з СГ = 7. Ці групи мають найбільшу кількість зразків з підвищеною експресією. Ймовірно, П на стадії 1-2 і з СГ=7 могли бути максимально чутливими до лікування препаратами інгібіторами білків цих генів. Однак, навіть у цих групах є зразки зі зниженою BE, які є нижчими, ніж медіана групи А. Тут виникає питання, чи можуть такі зразки бути менш чутливими до специфічних препаратів для цих генів? Тому можна сказати, що чутливість до препаратів вище в цих групах, хоча краще визначати індивідуальні значення BE, що відповідає підходам персоналізованої медицини [524, 527]. Рівні BE гена *LDLR* достовірно знижувалась в прогресуючих пухлинах (стадія 3-4) і з більш високим СГ, порівняно з П стадії 1-2. Ген *LDLR* не виявляв відмінностей у BE, порівняно з аденомами. Наші дані підтримуються іншими авторами [932]. Ми припускаємо зниження чутливості препаратів-інгібіторів при раку ПЗ 3-4 стадії.

Рівні BE гена *HMGCR* знижується в П 3-4 стадії порівняно з групою А. З одного боку, цей факт може бути перешкодою для використання статинів [892],

з іншого боку, це може бути важливою причиною для лікування пацієнтів з ензалутамідом: повідомлялося, що резистентність до ензалутаміду зазвичай розвивається, коли підвищується експресія гена *HMGCR*, тоді як при зниженні ВЕ гена ефективність лікування буде підвищуватись [933]. Важливим є те, що ензалутамід нещодавно був схвалений для лікування кастраційно стійкого раку ПЗ [934]. Тому ми вважаємо, що ген *HMGCR* є важливим фармакологічним маркером. Більш того, його рівні слід оцінювати до прийняття рішення про лікування хворих на рак ПЗ.

На відміну від повідомлень авторів, які продемонстрували високу експресію ВЕ гена *CPT1C* в агресивних пухлинах передміхурової залози [742, 745], ми виявили низькі рівні його ВЕ у всіх досліджених групах пухлин.

Цікаво, що дослідження кореляцій між ВЕ генів ліпідного метаболізму та маркерів епітелійних та стромальних елементів показало, що експресія генів *FASN*, *LDLR* і *HMGCR* корелює з експресією маркерів епітелійних клітин і генів, пов'язаних з раком ПЗ, а саме генів *CDH1*, *AR1isof*, *KRT18*, *OCLN*, *NKX3-1*, тоді як рівні ВЕ генів *COX2* і *CPT1C* демонструють таку ж тенденцію залежностей ВЕ з маркерами ПАФ (гени *ACTA2*, *CXCL12*, *CTGF*), маркерами мезенхімних клітин (гени *CDH2*, *FN1*) і генами, асоційованими з запаленнями (*CIAS*, *IRF1* та інші). Негативні кореляції ВЕ гена *COX2* показали з маркерами епітелійних клітин (гени *PSA*, *KRT18*) [754]. Ці особливості можуть відображати відмінності в експресії зазначених генів у різних типах клітин, а також наявність різних механізмів, що контролюють експресію цих генів, як показано раніше [360, 362, 367].

Відомо, що вивчення специфічних взаємодій пухлин-організм є дуже складним завданням. Для вирішення цієї проблеми, принаймні, частково, були відібрані специфічні маркери різних типів клітин, і ВЕ генів були оцінені в доброякісних і злоякісних пухлинах передміхурової залози. Ми прагнули знайти клінічно значущі зміни в експресії генів. Ми виявили значущі зміни в ВЕ тільки для частки досліджуваних генів [779, 780]. З 8 генів ПАФ зміни ВЕ виявлено лише для 6 в групах ПНА, що містять пухлини на різних стадіях.

Відзначимо, що відомий ПАФ маркер ген *ACTA2* [935] показав зміни ВЕ тільки в групі парних П/Н зразків. Гени *CXCL14*, *CTGF*, *FAP* і *THY1* також диференційно експресуються в пухлинах і УНТ і вони показують зміни в ВЕ при групуванні ПНА, включаючи пухлини різних стадій. Ці підвищені в пухлинах ВЕ чотирьох генів кодують білки, секретуються ПАФ. Вони відіграють важливу роль у паракринних взаємодіях в мікрооточеннях пухлини, підвищуючи прогресування пухлини і метастазування [777]. Більш того, білок *FAP* проявляє імуносупресивні властивості [936]. Рівні ВЕ генів *HIF1A* і *S100A4* (також експресіюється ПАФ) корелювали зі стадією пухлин. Тільки гени ПАФ продемонстрували кореляцію ВЕ з молекулярними характеристиками пухлин ПЗ, та наявністю ГТ *TMPRSS2-ERG* і рівнями ВЕ гена *PTEN*. Можливо, це свідчить про найбільш близький і особливий тип взаємодії між клітинами пухлин і фібробластів, як матрично-регулюючих елементів строми ПЗ [766, 770, 935], які є важливими складовими створення пухлино-асоційованих ніш і, згідно даним літератури *FAP*- та *ACTA2*-експресуючі фібробласти здатні розповсюджуватись з кровотоком по всьому організму і, як ми припускаємо, мати значний вплив на метастазування пухлин [937, 938].

Гени групи TAM показали змінені рівні ВЕ в групуванні ПНА, включаючи пухлини на різних стадіях. Деякі з генів продемонстрували зміни ВЕ у групах з різними СГ та наявністю ГТ *TMPRSS2-ERG*. Всі 6 генів TAM корелювали зі стадіями пухлин. Відомо, що ці маркери мають значуще клінічне значення [763, 772, 938]. Ген *NOS2A* є маркером нормальних, неракових макрофагів [939], тоді як ген *CD163* є маркером TAM [940]. Ген *CD68* має суперечливі дані щодо його експресії у певному фенотипі макрофагів [941]. Гени *CCR4*, *CCL17* та *CCL22* пов'язані з переходом макрофагів в TAM, тобто вони відіграють певну роль у прогресії пухлин [771].

Найменша кількість генів із зміненими рівнями ВЕ виявляється в групі ІАГ. Тільки два гени *CTLA4* та *IL1R1* показали зміни ВЕ в групуванні ПНА, включаючи пухлини різних стадій. ВЕ генів *IL1R1* та *MSMB* мали значущі відмінності у групі парних П/Н. Відомо, що інгібування експресії гена *CTLA4*

дуже важливо в імунотерапії раку передміхурової залози, завдяки тому, що білок CTLA4 передає імунні інгібуючі сигнали до Т-клітин [942]. Сигналізація IL1R1 пригнічує проліферацію пухлинних клітин молочної залози на ранніх стадіях пухлин [943].

Як свідчить гістологічний аналіз пухлинам ПЗ притаманні вогнищеві осередки лейкоцитарної інфільтрації [944]. Таким чином, експресія генів лейкоцитів може значно відрізнятись в межах одного зразка [773, 778]. Виходячи з цього, для нас було важливо оцінити експресію генів у різних імунних клітинах. Індекс імунної оцінки також може мати свої власні незалежні діагностичні та прогностичні значення [945, 946]. Необхідно вивчити більш відповідні маркери канцерогенезу передміхурової залози, щоб виявити клінічно значущі зміни імунного захисту та реакцій.

Спостережувана висока дисперсія значень ВЕ робить не можливим, знаходження реальної різниці між групами зразків для всіх генів. Крім того, відсутність адекватного контролю (ПЗ здорових донорів з відповідним віком і національністю) також вплинуло на експериментальні результати. Крім того, зміни в експресії досліджуваних генів в аденомах і УНТ можуть мати специфічний характер, що свідчить про вплив процесів гіпертрофії та гіперплазії при розвитку аденом і на вплив злоякісних пухлин на УНТ, особливо на пізніх стадіях розвитку пухлин [778, 944]. Це припущення підтверджується результатами цього дослідження [720, 730, 779]. Ми отримали різну кількість генів із змінами ВЕ в групі парних П/Н (11 генів) і в аденомах, враховуючи стадії пухлин (14 генів). Відзначимо, що гени *ACTA2* і *MSMB* показали зміни ВЕ тільки в парних вибірках. Несподівано ген *ACTA2* був високоекспресований в А. Ймовірно, це пов'язано з специфічною експресією різних ізоформ гена *ACTA2* при розвитку пухлин і його специфічної експресії в різних типах клітин, таких як гладком'язові клітини та міофібробласти [777, 935]. Отримав приблизно однакові результати для багатьох генів, коли у групі пухлин гени мають великий рівень дисперсії ВЕ, це може відчити про присутність зразків, які належать до різних молекулярних підгруп та підтипів.

У цьому випадку необхідно встановити ознаки, які утворюють ці підгрупи. Для перевірки цієї гіпотези ми використали статистичні підходи, а саме методи класифікації та кластеризації. Кластеризація аденокарцином за генами ЕМП дала можливість виявити 2 молекулярних підтипи аденокарцином ПЗ без значущих відмінностей за КПХ.

Згідно даних кластеризації ЕМП-пов'язаних генів ми виявили 2 кластери зразків аденокарцином зі специфічними рівнями BE генів, які характерні потенційно різним підтипам пухлин.

Гени в кластері 1 високо експресують епітелійні маркери (*CDH1*, *OCLN*, *KRT18*) і маркери люмінальних клітин *AR* (1 ізоф), *NKX3-1*, *PSA*). Висока експресія цих генів характерна для люмінального підтипу пухлин [867, 868]. Крім того, кластер 1 показав високий BE двох lncRNA (*PCA3* і *SCHLAP1*). *PCA3* є дуже високою специфічною lncRNA в клітинах ПЗ [869]. BE *SCHLAP1* пов'язана з метастатичним прогресуванням при раку ПЗ [870].

Протилежний стан рівнів BE спостерігається в кластері 2 аденокарцином. Для нього виявлено низьку експресію маркерів епітелійних клітин і високу експресію мезенхімних маркерів (*CDH2*, *FN1*, *VIM*). Це характерно для базального підтипу раку ПЗ, з одного боку [868, 872]. З іншого боку, це також характерно для ракових стовбурових клітин [872]. Крім того, також виявлено високий рівень BE lncRNA *HOTAIR*, а *HOTAIR* – високо-специфічна lncRNA, яка експресується у субпопуляції ракових стовбурових клітин [871].

Ми припускаємо, що зразки раку передміхурової залози з різних кластерів можуть бути предметом різних онкогенних шляхів, механізмів канцерогенезу і, як наслідок, вони можуть мати різну чутливість до ліків і прогноз захворювання [868].

Вивчення молекулярного профілювання раку ПЗ іншими дослідниками виявило від 3 до 7 підтипів раку ПЗ відповідно до змін транскриптомів, заснованих на генетичних, епігенетичних і транскриптомних змінах сотень генів [850, 872]. Тому для того, щоб запропонувати молекулярний профіль

підтипів раку, ми далі досліджуватимемо конкретні зміни рівнів ВЕ більшої кількості генів.

Додавання у аналіз до ЕМП-пов'язаних генів ще простато-специфічних генів дозволило отримати 3 кластери аденокарцином ПЗ зі специфічними профілями ВЕ та значущими відмінностями у КПХ між кластерами [730].

Наші експериментальні дані про патерни ВЕ при аденокарциномах передміхурової залози узгоджуються з даними літератури [721, 947]. Загально визнано, що висока експресія епітелійних і люмінальних маркерів зазвичай супроводжується низькою експресією мезенхімних маркерів, що ми і спостерігали в кластері 1. Важливо, що ми показали одночасно високу експресію гібридного транскрипта, *PCA3* і *NKX3-1* в одному кластері пухлин. Здається, що гібридний транскрипт і *PCA3* не впливають негативно на експресію відомого гена-супресора *NKX3-1* і навпаки, оскільки вони належать до різних шляхів [721, 947]. З іншого боку, онкогенний шлях *PCA3* [863, 925], ймовірно, діє паралельно з шляхом *ERG* [696, 697].

Щоб підсумувати дані трьох підтипів, важливо відзначити особливості кластерів. Кластер 1, який містить всі ГТ-позитивні аденокарциноми, має найбільш характерний профіль експресії для епітеліальних клітин і є ГТ *TMPRSS2-ERG*-позитивним андрогензалежним люмінальним підтипом 1. Ймовірно, онкогенні шляхи в цій групі є *ERG* і *PCA3* [686, 863] з високою чутливістю до андрогенів, пролактину, IGF-стимулювання онкогенної сигналізації.

Ми припускаємо, що кластер 3 є іншим підтипом раку ПЗ, перш за все це ГТ-негативні з незалежними від андрогенів та характеристиками стійкості до кастрації [863] (*TMPRSS2-ERG*-негативний андроген незалежний люмінальний підтип 2). Він має пухлини з 3-4 стадіями та специфічні молекулярні властивості як найнижча експресія гена *AR* та знижена експресія епітелійних маркерів (генів *CDH1*, *OCLN*, *NKX3-1*), генів *SRD5A2*, *INSR (A i B)* і *IGF1R*, високі рівні експресії мезенхімних маркерів (*VIM*, *FN1*, *MMP2*) і lncRNAs *SCHLAP1* та *HOTAIR*. Більш того, збільшення ВЕ *HOTAIR* може викликати

стійкість до ензалутаміду [874]. Це унікальний кластер з найвищим рівнем експресії гена *PRL*, який може сприяти прогресуванню раку через сигнальний шлях *PRL / STAT5* [728]. Це може означати вплив пролактину у цьому підтипі на канцерогенез та необхідність його коригування.

Кластер 2 має, як і перший підтип, аденокарциноми 1-2 стадії, але є змішаним стовбуроподібним андрогензалежним підтипом. Найнижча експресія деяких епітелійних і люмінальних маркерів гнів *KRT18*, *PCA3*, *PSA* і висока експресія для мезенхімних маркерів генів *CDH2*, *MMP2*, і тенденція до зростання ВЕ генів *FNI* і *VIM* є характеристиками стовбуроподібного (базального) раку передміхурової залози, незважаючи на високу ВЕ генів *AR*, *CDH1*, *NKX3-1*. Найвищі рівні ВЕ генів *ESR1*, *SRD5A2*, *INSRB*, *PRLR* і lncRNA *HOTAIR* надають цьому кластеру підвищені канцерогенні властивості.

Але ще більш цікавим фактом є висока кореляція між цими трьома кластерами пухлин та трьома кластерами, отриманими за результатами кластеризації генів маркерів ПАФ, ПАМ та ІАГ [779, 875]. Це і є показником взаємодії та взаємовпливу клітин пухлин та елементів строми цих пухлин [780].

Кластер 1 аденокарцином складається з *TMPRSS2-ERG*-позитивних андроген-чутливих пухлин люмінального підтипу 1. Ці пухлини, на додаток до високої чутливості до андрогенів, демонструють високу чутливість до пролактину, фактора росту інсуліну 1, інсуліну, що стимулює онкогенні сигнали мають активовані онкогенні шляхи, що включають *ERG* і *PCA3*. Кластер ПАФ 1, що відповідає цьому кластеру 1 аденокарцином, характеризується найнижчими рівнями ВЕ маркерів ПАФ, що свідчить про невелику кількість цих клітинних елементів та їх низьку активність, що свідчить про сприятливий прогноз для цього підтипу раку.

Для кластеру 2 пухлинних маркерів і характеристик пухлин ПАФ є одна й та ж стадія, як у кластері 1. Однак, кілька епітелійних і люмінальних маркерів (гени *KRT18*, *PCA3*, *PSA*) показали найнижчі рівні ВЕ, тоді як мезенхімні маркери (гени *CDH2*, *MMP2*, *FNI*, *VIM*) були високо-експресовані. Це відповідає стовбурово-клітинному (базальному) підтипу раку ПЗ [867].

Одночасно високо-експресовані гени *ESR1*, *SRD5A2*, *INSRB*, *PRLR* і lncRNA *HOTAIR* свідчать про те, що цей кластер включає пухлини з підвищеними канцерогенними властивостями. Кластер 2 ПАФ включає зразки з найвищими рівнями ВЕ шести генів: *ACTA2*, *CXCL12*, *CTGH*, *THY1*, *HIF1A*, *FAP*, пов'язані з поганим прогнозом перебігу захворювання.

Кластер 3 містить пухлини ПЗ на стадії 3-4. Переважно пухлини є незалежними від андрогенів і кастрат-стійкими але люмінального підтипу. Характеристики ПАФ знаходяться між кластерами 1 і 2. Однак зразки в цьому кластері показують дуже високий рівень ВЕ ТАМ-маркера гена *CD163*, який зазвичай експресується в макрофагах М2. Очевидно, що пухлино-асоційовані макрофаги, що сприяють прогресуванню раку передміхурової залози [811].

Ми можемо розрізнити два молекулярні підтипи аденокарцином ПЗ люмінального типу (кластер 1 і 3) за специфічними характеристиками експресії генів пухлин на ранніх і пізніх стадіях. Цим двом підтипам відповідають два різних підтипу ПАФ, з високою і низькою експресією маркерів [875]. Аналогічна тенденція спостерігалася для ПАМ, ІАГ та загальних стромальних кластерів. Кластер 2 характеризує раки ПЗ на ранніх стадіях з підвищеним рівнем ВЕ базальних і пухлинних маркерів стовбурових клітин у кластері П і специфічними ВЕ рівнями ПАФ, ПАМ, ІАГ генів. Таким чином, ми виявили три молекулярні підтипи аденокарцином за особливостями ВЕ стромальних елементів, які збігалися з описаними нами раніше трьома підтипами раку ПЗ. Ці дані є дуже важливими для кращого розуміння механізмів канцерогенезу, впливу стромальних елементів, діагностики та розрізнення пухлин передміхурової залози для вибору персоналізованого лікування.

Оцінка нових біомаркерів для виявлення різних типів пухлин є актуальною задачею в практичній медицині. Багато дослідників розробляють різні типи наборів біомаркерів і діагностичних панелей для цієї мети (генетичні, епігенетичні, на основі експресії генів, експресії білків, протеомні, імуноаналіз, імуногістохімічні тощо).

Згідно даних NotI-мікропанелей та на основі результатів BE диференційно-експресованих генів є можливості для створення панелей для виявлення та розрізнення епітелійних пухлин, застосовуючи методи машинного навчання [528, 876-878]. Нами запропоновано набори для раку яєчника та передміхурової залози, створені за даними NotI-мікропанелей [552, 554].

Оцінка нових біомаркерів для виявлення різних типів пухлин є актуальною задачею в практичній медицині. Багато дослідників розробляють різні типи множинних маркерів і діагностичних панелей для цієї мети. Нещодавно запропоновано експресійний набір з 6 біомаркерів для виявлення раку ПЗ, аналізуючи зразки сечі. Цей набір має наступні статистичні показники: $Se=0,8$ і $Sp=0,63$ [948]. Інші клінічні дослідження пропонують різні варіанти генів *PCA3* [949], *TMPRSS2-ERG* та їх комбінації з BE інших генів (*GOLPH2*, *SPINK1* і т.д.), але Se і Sp цих панелей не перевищували 0,88 і 0,76 відповідно [950]. У наступному дослідженні, проведеному на китайській популяції, порівнювали два експресійні набори [951]. П/А ($Se = 0,966$, $Sp = 0,928$). Другий набір з восьми генів призначений для стратифікації низьких і високих СГ (які вони пояснюють як агресивний рак ПЗ і неагресивний рак ПЗ) з $Se = 0,9$, $Sp = 0,8$. Вони мають розмір вибірки для досліджень більше 120-150 зразків раку передміхурової залози, але статистичні характеристики запропонованих панелей нижче, ніж у наших варіантах наборів.

Крім того, як написано вище, MDR - це підхід до машинного навчання. Він розділяє аналізовані зразки як групи П/А на дві групи випадковим чином: навчання і тестування груп зразків. Це дає їм статистику перехресної перевірки з усіма параметрами як для цілого набору. Це дозволяє робити прогноз щодо можливого відхилення діагностичних значень досліджуваних потенційних панелей експресії. Важливо відзначити, що всі статистичні параметри (Ac , Se , Sp , OR , χ^2 квадрат) обох порівнюваних типів груп були узгоджені з параметрами їхніх цілих наборів даних. Крім того, як показали наші результати, при використанні генів з різних шляхів та маркерів різних типів клітин

спостерігаються більш високі статистичні показники розроблених експресійних наборів [907].

На основі сучасних парадигм, отриманих нами результатів та даних літератури можна запропонувати наступну узагальнюючу (інтегративну) концепцію канцерогенезу (рис. 4.1).

Існує низка ендогенних (I) та екзогенних (II) чинників, які з плином часу, тобто віку (III) можуть вплинути як індуктори канцерогенезу, спричиняючи ініціацію онкологічних захворювань, які є багатофакторними за своєю природою та багатостадійними за розвитком у часі (IV). Пухлинні клітини хоч і набувають відомих ознак і властивостей, притаманних трансформованим та іморталізованим клітинам, але вони мають як загально-пухлинні, так і пухлино-специфічні порушення: генетичні та/або епігенетичні, експресійні порушення, як свідчать наші дослідження. Завдяки різноманітності цих змін відбувається



Рис. 4.1. Узагальнююча концепція канцерогенезу за результатами дисертаційної роботи, сучасних парадигм та даних літератури

інактивация низки генів-супресорів пухлин та активація певних онкогенних шляхів, що характеризується розвитком порушень на різних рівнях контролю реалізації генетичної інформації (генетичному, епігенетичному, транскрипційному та інших). І як наслідок, ці зміни призводять до формування гетерогенності молекулярних характеристик пухлин (V). Про це свідчить виявлення молекулярних підтипів за характеристиками та особливостями профілів експресії генів пухлинних клітин на прикладі раку передміхурової залози (VI). Крім того ми показали, що гетерогенність є притаманною і клітинам стромы за досліджуваними показниками ПАФ, ПАМ та низки генів, пов'язаних з запаленням та імунною системою, відповідаючи змінам, які відбулись у пухлинних клітинах (V), що підтверджується показниками високої кореляції між молекулярними підтипами пухлинних клітин та клітин стромы, тобто є біологічно детермінованими (VI).

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

ВИСНОВКИ

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

1. Виявлено десятки генетичних та/або епігенетичних порушень генів та/або локусів 3-ої хромосоми людини в епітелійних пухлинах, які можуть свідчити про інактивацію пухлино-асоційованих та потенційних генів-супресорів пухлин за допомогою NotI-мікропанелей.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12. Виявлено 3 клінічно значущі молекулярні підтипи аденокарцином передміхурової залози як за рівнями відносної експресії груп генів маркерів

пухлинних клітин, так і стромальних елементів за допомогою кластерного аналізу.

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

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

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
3. Rosario SR, Long MD, Affronti HC, Rowsam AM, Eng KH, Smiraglia DJ. Pan-cancer analysis of transcriptional metabolic dysregulation using The Cancer Genome Atlas. *Nat Commun*. 2018 Dec 14;9(1):5330. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07232-8>.
4. Chakraborty S, Hosen MI, Ahmed M, Shekhar HU. Onco-Multi-OMICS Approach: A New Frontier in Cancer Research. *Biomed Res Int*. 2018 Oct 3;2018:9836256. <https://doi.org/10.1155/2018/9836256>.
5. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Aug;1348(1):20-31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>.
6. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1546-58. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>.
7. Luzzatto L. Somatic mutations in cancer development. *Environ Health*. 2011 Apr 5;10 Suppl 1:S12. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-10-S1-S12>.
8. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Nov 26. pii: a036798. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>.
9. Sharma S, Floren M, Ding Y, Stenmark KR, Tan W, Bryant SJ. A photoclickable peptide microarray platform for facile and rapid screening of 3-D tissue microenvironments. *Biomaterials*. 2017 Oct;143:17-28. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.025>.

10. Iurlaro R, León-Annicchiarico CL, Muñoz-Pinedo C. Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods Enzymol.* 2014; 542:59-80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00003-0>.
11. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Oct;2(10):a003236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>.
12. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):789-99.
13. Xu W, Gu J, Ren Q, Shi Y, Xia Q, Wang J, et al. NFATC1 promotes cell growth and tumorigenesis in ovarian cancer up-regulating c-Myc through ERK1/2/p38 MAPK signal pathway. *Tumour Biol.* 2016 Apr;37(4):4493-500. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4245-x>.
14. Moghadam AR, Patrad E, Tafsiri E, Peng W, Fangman B, Pluard TJ, et al. Ral signaling pathway in health and cancer. *Cancer Med.* 2017 Dec;6(12):2998-3013. <https://doi.org/10.1002/cam4.1105>.
15. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018 Jan;62:50-60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.002>.
16. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2015 Apr;137(1):173-9. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.003>.
17. Creighton CJ. Multiple oncogenic pathway signatures show coordinate expression patterns in human prostate tumors. *PLoS One.* 2008 Mar 19;3(3):e1816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001816>.
18. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, et al. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature.* 2006 Jan 19;439(7074):353-7.
19. Clifford SC, Prowse AH, Affara NA, Buys CH, Maher ER. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998 Jul;22(3):200-9.

20. van den Berg A, Buys CH. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Jun;19(2):59-76.
21. Braga E, Pugacheva E, Bazov I, Ermilova V, Kazubskaya T, Mazurenko N, et al. Comparative allelotyping of the short arm of human chromosome 3 in epithelial tumors of four different types. *FEBS Lett*. 1999 Jul 9;454(3):215-9.
22. Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res*. 1997;71:27-92.
23. Protopopov R, Boldog F, Erlandsson R, Kashuba VI, Allikmets RL, Marcsek Z, Kisselev LL, Stanbridge E, Klein G, Sumegi J, et al. New strategy for mapping the human genome based on a novel procedure for construction of jumping libraries. *Genomics*. 1991 Dec;11(4):1030-9.
24. Kashuba VI, Szeles A, Allikmets R, Nilsson AS, Bergerheim US, Modi W, et al. A group of NotI jumping and linking clones cover 2.5 Mb in the 3p21-p22 region suspected to contain a tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995 Jun;81(2):144-50.
25. Kashuba VI, Szeles A, Allikmets R, Nilsson AS, Bergerheim US, Modi W, et al. A group of NotI jumping and linking clones cover 2.5 Mb in the 3p21-p22 region suspected to contain a tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995 Jun;81(2):144-50.
26. Allikmets RL, Kashuba VI, Pettersson B, Gizatullin R, Lebedeva T, Kholodnyuk ID, et al. NotI linking clones as a tool for joining physical and genetic maps of the human genome. *Genomics*. 1994 Jan 15;19(2):303-9.
27. Allikmets R, Kashuba VI, Huebner K, LaForgia S, Kisselev LL, Klein G, et al. Mapping of 22 NotI linking clones on human chromosome 3 by polymerase chain reaction and somatic cell hybrid panels. *Chromosome Res*. 1996 Jan;4(1):33-7.
28. Wei MH, Latif F, Bader S, Kashuba V, Chen JY, Duh FM, et al. Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res*. 1996 Apr 1;56(7):1487-92.

29. Dmitriev AA, Kashuba VI, Haraldson K, Senchenko VN, Pavlova TV, Kudryavtseva AV, et al. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*. 2012 May;7(5):502-13. <https://doi.org/10.4161/epi.19801>.
30. Dmitriev AA, Rudenko EE, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gordiyuk VV, Melnikova NV, et al. Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:735292. <https://doi.org/10.1155/2014/735292>.
31. Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics*. 2013 Apr;8(4):409-20. <https://doi.org/10.4161/epi.24233>.
32. Haraldson K, Kashuba VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Kudryavtseva AV, Pavlova TV, et al. LRRC3B gene is frequently epigenetically inactivated in several epithelial malignancies and inhibits cell growth and replication. *Biochimie*. 2012 May;94(5):1151-7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.019>.
33. Grigorieva EV, Prudnikova TY, Domanitskaya NV, Mostovich LA, Pavlova TV, Kashuba VI, et al. D-glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation *in vitro* and tumour growth in vivo. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28;105(1):74-82. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.170>.
34. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):472-82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>.
35. Zhou X, Yang X, Sun X, Xu X, Li X, Guo Y, et al. Effect of PTEN loss on metabolic reprogramming in prostate cancer cells. *Oncol Lett*. 2019 Mar;17(3):2856-2866. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9932>.
36. Lue HW, Podolak J, Kolahi K, Cheng L, Rao S, Garg D, et al. Metabolic reprogramming ensures cancer cell survival despite oncogenic signaling blockade. *Genes Dev*. 2017 Oct 15;31(20):2067-2084. <https://doi.org/10.1101/gad.305292.117>.

37. Li M, Bu X, Cai B, Liang P, Li K, Qu X, Shen L. Biological role of metabolic reprogramming of cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (Review). *Oncol Rep.* 2019 Feb;41(2):727-741. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6882>.
38. Aguilar E, Marin de Mas I, Zodda E, Marin S, Morrish F, Selivanov V, et al. Metabolic Reprogramming and Dependencies Associated with Epithelial Cancer Stem Cells Independent of the Epithelial-Mesenchymal Transition Program. *Stem Cells.* 2016 May;34(5):1163-76. <https://doi.org/10.1002/stem.2286>.
39. Dang CV, Kim JW. Convergence of Cancer Metabolism and Immunity: an Overview. *Biomol Ther (Seoul).* 2018 Jan 1;26(1):4-9. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.194>.
40. Min HY, Lee HY. Oncogene-Driven Metabolic Alterations in Cancer. *Biomol Ther (Seoul).* 2018 Jan 1;26(1):45-56. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.211>.
41. Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. *Trends Cancer.* 2016 Jul;2(7):365-377.
42. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res.* 2010 May 1;316(8):1324-31. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>.
43. McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Mar;12(3):217-28. <https://doi.org/10.1038/nrd3870>.
44. Belli C, Trapani D, Viale G, D'Amico P, Duso BA, Della Vigna P, et al. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2018 Apr;65:22-32. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.02.004>.
45. Erdogan B, Webb DJ. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans.* 2017 Feb 8;45(1):229-236. <https://doi.org/10.1042/BST20160387>.
46. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M, Lehti K. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int J Mol Sci.* 2018 May 21;19(5). pii: E1532. <https://doi.org/10.3390/ijms19051532>.

47. Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal*. 2011 Sep 13;9:18. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-18>.
48. Bodnar M, Szyberg Ł, Kazmierczak W, Marszalek A. Tumor progression driven by pathways activating matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J Oral Pathol Med*. 2015 Jul;44(6):437-43. <https://doi.org/10.1111/jop.12270>.
49. Eiro N, Fernandez-Gomez J, Sacristán R, Fernandez-Garcia B, Lobo B, Gonzalez-Suarez J, et al. Stromal factors involved in human prostate cancer development, progression and castration resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Feb;143(2):351-359. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2284-3>.
50. Luga V, Wrana JL. Tumor-stroma interaction: Revealing fibroblast-secreted exosomes as potent regulators of Wnt-planar cell polarity signaling in cancer metastasis. *Cancer Res*. 2013 Dec 1;73(23):6843-7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1791>.
51. Ramamonjisoa N, Ackerstaff E. Characterization of the Tumor Microenvironment and Tumor-Stroma Interaction by Non-invasive Preclinical Imaging. *Front Oncol*. 2017 Jan 31;7:3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00003>.
52. Кашуба ВІ. Нові гени-супресори епітеліальних пухлин. Автореф. дис. доктора біол. наук., ІМБГ НАНУ, Спеціальність 03.00.03 – молекулярна біологія. Київ 2009, 40с.
53. Гордіюк ВВ. Характеристика генетичних та епігенетичних змін генів/локусів 3-ої хромосоми людини в епітеліальних пухлинах. Автореф. дис. Канд. біол. наук., ІМБГ НАНУ, Спеціальність 03.00.03 – молекулярна біологія. Київ, 2008, 23с.
54. Кондратов ОГ. Інактивація потенційних генів-супресорів пухлин людини ITGA9, GLCE, LRRC3B та WNT7A в карциномах молочної залози та нирок. Автореф. дис. Канд. біол. наук., ІМБГ НАНУ, Спеціальність 03.00.03 – молекулярна біологія. Київ, 2012, 25с.

55. Руденко ЄЄ. Пошук потенційних генів-супресорів пухлинного росту для світло клітинної карциноми нирки. Автореф. дис. Канд. біол. наук., ІМБГ НАНУ, Спеціальність 03.00.02 – молекулярна генетика. Київ, 2016, 21с.
56. Розенберг ЄЕ. Диференційно-експресовані гени та генетичні й епігенетичні зміни у пухлинах простати людини. Автореф. дис. Канд. біол. наук., ІМБГ НАНУ, Спеціальність 03.00.03 – молекулярна біологія. Київ, 2018, 24с.
57. Онкологія: підручник (ВНЗ IV р. а.) / Г.В. Бондар, Ю.В. Думанський, О.Ю. Попович та ін.; за ред. Г.В. Бондаря, Ю.В. Думанського, О.Ю. Поповича Всеукраїнське спеціалізоване видавництво «Медицина», 2013, 544с.
58. Oxford handbook of oncology / Cassidy J., Bissett D., Obe R.S., Oxford University Press, 2002, 717p.
59. John E. Niederhuber; James O. Armitage; James H Doroshow; Michael B. Kastan; Joel E. Tepper. *Abeloff's Clinical Oncology E-Book*. Elsevier Health Sciences, January 2019, 625p.
60. Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin MD, Whelan S. *International Classification of Diseases for Oncology; Third edition, 1st revision WHO, December 2013, 242p.*
61. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>.
62. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
63. Рак в Україні 2016-2017 роки. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень Національного канцер-реєстру України №19, 2018, <http://www.ncru.inf.ua>.
64. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and

- metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct 8;388(10053):1659-1724. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).
65. Boffetta P, Jayaprakash V, Yang P, Asomaning K, Muscat JE, Schwartz AG, et al. Tobacco smoking as a risk factor of bronchioloalveolar carcinoma of the lung: pooled analysis of seven case-control studies in the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Cancer Causes Control*. 2011 Jan;22(1):73-9. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9676-5>.
66. Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Semin Oncol Nurs*. 2016 Aug;32(3):241-54. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.005>.
67. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones*. 2016 Jul;48(3):228-238.
68. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*. 2010 Oct;31(10):1703-9. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq087>.
69. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*. 1954 Mar;8(1):1-12.
70. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. 1954. *Int J Epidemiol*. 2004 Dec;33(6):1174-9.
71. Bevan RJ, Harrison PTC. Threshold and non-threshold chemical carcinogens: A survey of the present regulatory landscape. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017 Aug;88:291-302. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.01.003>.
72. Hardonnière K, Huc L, Sergent O, Holme JA, Lagadic-Gossmann D. Environmental carcinogenesis and pH homeostasis: Not only a matter of dysregulated metabolism. *Semin Cancer Biol*. 2017 Apr;43:49-65. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.01.001>.
73. Smith AJ, Smith LA. Viral Carcinogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;144:121-168. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.007>.

74. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(3):135-40.
75. Knudson A. Retinoblastoma: teacher of cancer biology and medicine. *PLoS Med.* 2005 Oct;2(10):e349.
76. Lohmann DR. RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat.* 1999;14(4):283-8.
77. Brassett C, Joyce JA, Froggatt NJ, Williams G, Furniss D, Walsh S, et al. Microsatellite instability in early onset and familial colorectal cancer. *J Med Genet.* 1996 Dec;33(12):981-5.
78. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006 Aug 30;600 (1-2):37-45. Epub 2006 Jul 11.
79. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1994 Jul;145(1):148-56.
80. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer.* 1992 Sep 15;70(6 Suppl):1727-31.
81. Denes J, Krewski D. An exact representation for the generating function for the Moolgavkar-Venzon-Knudson two-stage model of carcinogenesis with stochastic stem cell growth. *Math Biosci.* 1996 Jan 15;131(2):185-204.
82. Zeka A, Gore R, Kriebel D. The two-stage clonal expansion model in occupational cancer epidemiology: results from three cohort studies. *Occup Environ Med.* 2011 Aug;68(8):618-24.
83. Castrén O. Implications of a two-stage clonal expansion model to indoor radon risk assessment. *Health Phys.* 1999 Apr;76(4):393-7.
84. Moolgavkar SH, Day NE, Stevens RG. Two-stage model for carcinogenesis: Epidemiology of breast cancer in females. *J Natl Cancer Inst.* 1980 Sep;65(3):559-69.
85. Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, et al. Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol.* 2007 Nov;3(11):e225.

86. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, et al. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4283-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712345105>. Epub 2008 Mar 12.
87. Moolgavkar SH, Dewanji A, Venzon DJ. A stochastic two-stage model for cancer risk assessment. I. The hazard function and the probability of tumor. *Risk Anal*. 1988 Sep;8(3):383-92.
88. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3.
89. Little MP. Are two mutations sufficient to cause cancer? Some generalizations of the two-mutation model of carcinogenesis of Moolgavkar, Venzon, and Knudson, and of the multistage model of Armitage and Doll. *Biometrics*. 1995 Dec;51(4):1278-91.
90. Little MP, Wright EG. A stochastic carcinogenesis model incorporating genomic instability fitted to colon cancer data. *Math Biosci*. 2003 Jun;183(2):111-34.
91. Little MP, Vineis P, Li G. A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. *J Theor Biol*. 2008 Sep 21;254(2):229-38. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.05.027>.
92. Weinberg RA. Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1092-5. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn104>.
93. Little MP. Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct*. 2010 Apr 20;5:19; discussion 19. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-94>. Lichtenstein AV. Cancer: evolutionary, genetic and epigenetic aspects. *Clin Epigenetics*. 2010 Dec;1(3-4):85-100. <https://doi.org/10.1007/s13148-010-0010-6>.
95. Lichtenstein AV. Cancer: shift of the paradigm. *Med Hypotheses*. 2008 Dec;71(6):839-50. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.07.041>.
96. Grotenhuis BA, Wijnhoven BP, van Lanschot JJ. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors. *J Surg Oncol*. 2012 Aug 1;106(2):209-15. <https://doi.org/10.1002/jso.23069>. Epub 2012 Feb 27.

97. Rahman M, Deleyrolle L, Vedam-Mai V, Azari H, Abd-El-Barr M, Reynolds BA. The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls. *Neurosurgery*. 2011 Feb;68(2):531-45; discussion 545. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e3181ff9eb5>.
98. Bissell MJ, Weaver VM, Lelièvre SA, Wang F, Petersen OW, Schmeichel KL. Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res*. 1999 Apr 1;59(7 Suppl):1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
99. Laconi E, Doratiotto S, Vineis P. The microenvironments of multistage carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2008 Oct;18(5):322-9. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.019>. Epub 2008 Apr 1.
100. Potter JD. Morphostats: a missing concept in cancer biology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Mar;10(3):161-70.
101. Potter JD. Morphogens, morphostats, microarchitecture and malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun;7(6):464-74.
102. van den Brink GR, Offerhaus GJ. The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell*. 2007 Feb;11(2):109-17.
103. Baker SG, Soto AM, Sonnenschein C, Cappuccio A, Potter JD, Kramer BS. Plausibility of stromal initiation of epithelial cancers without a mutation in the epithelium: a computer simulation of morphostats. *BMC Cancer*. 2009 Mar 23;9:89. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-89>.
104. Bizzarri M, Cucina A. Tumor and the microenvironment: a chance to reframe the paradigm of carcinogenesis? *Biomed Res Int*. 2014; 2014:934038.
105. Morgillo F, Dallio M, Della Corte CM, Gravina AG, Viscardi G, et al. Carcinogenesis as a Result of Multiple Inflammatory and Oxidative Hits: a Comprehensive Review from Tumor Microenvironment to Gut Microbiota. *Neoplasia*. 2018 Jul;20(7):721-733. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.05.002>.
106. Aggarwal BB, Sung B. The relationship between inflammation and cancer is analogous to that between fuel and fire. *Oncology (Williston Park)*. 2011 Apr 30;25(5):414-8.

107. Korniluk A, Koper O, Kemona H, Dymicka-Piekarska V. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci.* 2017 Feb;186(1):57-62. <https://doi.org/10.1007/s11845-016-1464-0>.
108. Wang S, Ma N, Zhao W, Midorikawa K, Kawanishi S, Hiraku Y, et al. Inflammation-Related DNA Damage and Cancer Stem Cell Markers in Nasopharyngeal Carcinoma. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:9343460. <https://doi.org/10.1155/2016/9343460>.
109. Jia D, Nagaoka Y, Katsumata M, Orsulic S. Inflammation is a key contributor to ovarian cancer cell seeding. *Sci Rep.* 2018 Aug 17;8(1):12394. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30261-8>.
110. McDonald PC, Chafe SC, Dedhar S. Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction. *Front Cell Dev Biol.* 2016 Mar 31;4:27. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00027>.
111. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603-16. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
112. Gonda TA, Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle.* 2009 Jul 1;8(13):2005-13.
113. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:762825. <https://doi.org/10.1155/2012/762825>.
114. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2016;81:163-175. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030791>.
115. Pakravan N. Tumorigenesis: cell defense against hypoxia? *Oncol Rev.* 2013 Apr 22;7(1):e1. <https://doi.org/10.4081/oncol.2013.e1>.
116. Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014 Mar;46(3):214-9. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt148>.

117. Kipanyula MJ, Seke Etet PF, Vecchio L, Farahna M, Nukenine EN, Nwabo Kamdje AH. Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer. *Cell Signal*. 2013 Feb;25(2):403-16. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.10.014>.
118. Poutahidis T, Erdman SE. Commensal bacteria modulate the tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2016 Sep 28;380(1):356-8. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.12.028>.
119. Read SA, Douglas MW. Virus induced inflammation and cancer development. *Cancer Lett*. 2014 Apr 10;345(2):174-81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.030>.
120. Akram N, Imran M, Noreen M, Ahmed F, Atif M, Fatima Z, et al. Oncogenic Role of Tumor Viruses in Humans. *Viral Immunol*. 2017 Jan/Feb;30(1):20-27. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0109>. Epub 2016 Nov 10.
121. Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol*. 2013 Apr 15;190(8):3831-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203487>.
122. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3347-55. <https://doi.org/10.1172/JCI80007>.
124. Ivy KS, Brent Ferrell P Jr. Disordered Immune Regulation and its Therapeutic Targeting in Myelodysplastic Syndromes. *Curr Hematol Malig Rep*. 2018 Jun 22. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0463-9>.
125. Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: An overview. *J Immunol Methods*. 2018 Dec;463:21-26. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.005>.
126. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>.
127. Zhang X, Meng X, Chen Y, Leng SX, Zhang H. The Biology of Aging and Cancer: Frailty, Inflammation, and Immunity. *Cancer J*. 2017 Jul/Aug;23(4):201-205. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000270>.

128. Riscuta G. Nutrigenomics at the Interface of Aging, Lifespan, and Cancer Prevention. *J Nutr.* 2016 Oct;146(10):1931-1939.
129. Zitvogel L, Pietrocola F, Kroemer G. Nutrition, inflammation and cancer. *Nat Immunol.* 2017 Jul 19;18(8):843-850. <https://doi.org/10.1038/ni.3754>.
130. Payne JK. State of the science: stress, inflammation, and cancer. *Oncol Nurs Forum.* 2014 Sep;41(5):533-40. <https://doi.org/10.1188/14.ONF.533-540>.
131. Powell ND, Tarr AJ, Sheridan JF. Psychosocial stress and inflammation in cancer. *Brain Behav Immun.* 2013 Mar;30 Suppl:S41-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.015>.
132. Tir AMD, Labor M, Plavec D. The effects of physical activity on chronic subclinical systemic inflammation. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2017 Dec 20;68(4):276-286. <https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-2965>.
133. Kerr J, Anderson C, Lippman SM. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. *Lancet Oncol.* 2017 Aug;18(8):e457-e471. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30411-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30411-4).
134. Bizzarri M, Cucina A. SMT and TOFT: Why and How They are Opposite and Incompatible Paradigms *Acta Biotheor.* 2016 Sep;64(3):221-39. <https://doi.org/10.1007/s10441-016-9281-4>.
135. Bedessem B, Rupy S. SMT or TOFT? How the two main theories of carcinogenesis are made (artificially) incompatible. *Acta Biotheor.* 2015 Sep;63(3):257-67. <https://doi.org/10.1007/s10441-015-9252-1>.
136. Soto AM, Sonnenschein C. The tissue organization field theory of cancer: a testable replacement for the somatic mutation theory. *Bioessays.* 2011 May;33(5):332-40.
137. Sonnenschein C, Soto AM. An Integrative Approach Toward Biology, Organisms, and Cancer. *Methods Mol Biol.* 2018;1702:15-26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7456-6_2.
138. Brücher BL, Jamall IS. Somatic Mutation Theory - Why it's Wrong for Most Cancers. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(5):1663-80. <https://doi.org/10.1159/000443106>.

139. Bedessem B, Ruphy S. SMT and TOFT Integrable After All: A Reply to Bizzarri and Cucina. *Acta Biotheor.* 2017 Mar;65(1):81-85. <https://doi.org/10.1007/s10441-016-9286-z>.
140. Grocott MP. Integrative physiology and systems biology: reductionism, emergence and causality. *Extrem Physiol Med.* 2013 Mar 22;2(1):9. <https://doi.org/10.1186/2046-7648-2-9>.
141. Grizzi F, Di Ieva A, Russo C, Frezza EE, Cobos E, Muzzio PC, et al. Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theor Biol Med Model.* 2006 Oct 17;3:37.
142. Janecka IP. Cancer control through principles of systems science, complexity, and chaos theory: a model. *Int J Med Sci.* 2007 Jun 5;4(3):164-73.
143. Giuliani A, Filippi S, Bertolaso M. Why network approach can promote a new way of thinking in biology. *Front Genet.* 2014 Apr 8;5:83. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00083>.
144. Sigston EAW, Williams BRG. An Emergence Framework of Carcinogenesis. *Front Oncol.* 2017 Sep 14;7:198. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00198>. eCollection 2017.
145. Sugimura T, Terada M, Yokota J, Hirohashi S, Wakabayashi K. Multiple genetic alterations in human carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1992 Nov;98:5-12.
146. Bessarabova M, Pustovalova O, Shi W, Serebriyskaya T, Ishkin A, Polyak K, et al. Functional synergies yet distinct modulators affected by genetic alterations in common human cancers. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3471-81. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3038>.
147. Niida A, Nagayama S, Miyano S, Mimori K. Understanding intratumor heterogeneity by combining genome analysis and mathematical modeling. *Cancer Sci.* 2018 Apr;109(4):884-892. <https://doi.org/10.1111/cas.13510>.
148. Mimori K, Saito T, Niida A, Miyano S. Cancer evolution and heterogeneity. *Ann Gastroenterol Surg.* 2018 Jul 4;2(5):332-338. <https://doi.org/10.1002/ags3.12182>.

149. Steuer CE, Behera M, Berry L, Kim S, Rossi M, Sica G, et al. Role of race in oncogenic driver prevalence and outcomes in lung adenocarcinoma: Results from the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer*. 2016 Mar 1;122(5):766-72. <https://doi.org/10.1002/cncr.29812>.
150. Varella-Garcia M. Chromosomal and genomic changes in lung cancer. *Cell Adh Migr*. 2010 Jan-Mar;4(1):100-6.
151. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, et al. Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol*. 2007 Apr;18(4):752-60.
152. Heighway J; Betticher DC. Lung tumors: an overview. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2004;8(2):137-139.
153. Micke P, Edlund K, Holmberg L, Kultima HG, Mansouri L, Ekman S, et al. Gene copy number aberrations are associated with survival in histologic subgroups of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011 Nov;6(11):1833-40. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182295917>.
154. Baykara O, Bakir B, Buyru N, Kaynak K, Dalay N. Amplification of chromosome 8 genes in lung cancer. *J Cancer*. 2015 Jan 20;6(3):270-5. <https://doi.org/10.7150/jca.10638>.
- 155 Vander Laan PA, Rangachari D, Mockus SM, Spotlow V, Reddi HV, Malcolm J, et al. Mutations in TP53, PIK3CA, PTEN and other genes in EGFR mutated lung cancers: Correlation with clinical outcomes. *Lung Cancer*. 2017 Apr;106:17-21. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.01.011>.
156. Yan M, Parker BA, Schwab R, Kurzrock R. HER2 aberrations in cancer: implications for therapy. *Cancer Treat Rev*. 2014 Jul;40(6):770-80. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.02.008>.
157. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II, et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma: The Lung Cancer Mutation Consortium Experience. *J Thorac Oncol*. 2015 May;10(5):768-777. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000516>.

157. Carcangiu ML; Casalini P, Mnard S. Breast tumors: an overview Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2005;9(4):331-337
158. English DP, Roque DM, Santin AD. HER2 expression beyond breast cancer: therapeutic implications for gynecologic malignancies. Mol Diagn Ther. 2013 Apr;17(2):85-99. <https://doi.org/10.1007/s40291-013-0024-9>.
159. Marty B, Maire V, Gravier E, Rigai G, Vincent-Salomon A, Kappler M, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. Breast Cancer Res. 2008;10(6):R101. <https://doi.org/10.1186/bcr2204>.
160. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. Anticancer Res. 2014 Mar;34(3):1387-400.
161. Ngeow J, Sesock K, Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. Breast Cancer Res Treat. 2017 Aug;165(1):1-8. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3665-z>.
162. Davis NM, Sokolosky M, Stadelman K, Abrams SL, Libra M, Candido S, et al. Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. Oncotarget. 2014 Jul 15;5(13):4603-50.
163. Sarrió D, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez-Estévez C, Guo M, Herman JG, et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. Int J Cancer. 2003 Aug 20;106(2):208-15.
164. Corso G, Intra M, Trentin C, Veronesi P, Galimberti V. CDH1 germline mutations and hereditary lobular breast cancer. Fam Cancer. 2016 Apr;15(2):215-9. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9869-5>.
165. Heigener DF, Schumann C, Sebastian M, Sadjadian P, Stehle I, Märten A, et al. Afatinib Compassionate Use Consortium (ACUC). Afatinib in Non-Small Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations Pretreated With Reversible EGFR Inhibitors. Oncologist. 2015 Oct;20(10):1167-74. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0073>.

166. Wang H, Zhang W, Wang K, Li X. Correlation between EML4-ALK, EGFR and clinicopathological features based on IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Jun;97(26):e11116. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011116>.
167. Chauchereau A, Aarab-Terrisse S. Prostate tumors: an overview. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;15(12):1067-1073.
168. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, et al. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 28;107(39):16759-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012443107>.
169. Meiers I, Shanks JH, Bostwick DG. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology*. 2007 Jun;39(3):299-304.
170. Gasi Tandefelt D, Boormans J, Hermans K, Trapman J. ETS fusion genes in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014 May 6;21(3):R143-52. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0390>.
171. Koelzer VH, Dawson H, Zlobec I, Lugli A. Colon: Colorectal adenocarcinoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2013;17(5):348-363.
172. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 19;18(1). pii: E197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
173. Kirzin S, Marisa L, Guimbaud R, De Reynies A, Legrain M, Laurent-Puig P, et al. Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific sub-type of cancer: a morphological, molecular and genetics study. *PLoS One*. 2014 Aug 1;9(8):e103159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103159>. eCollection 2014.
174. Cuyle PJ, Prenen H. Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer. *Acta Clin Belg*. 2017 Apr;72(2):103-115. <https://doi.org/10.1080/17843286.2016.1262996>.

175. Day FL, Jorissen RN, Lipton L, Mouradov D, Sakthianandeswaren A, Christie M, et al. PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 Jun 15;19(12):3285-96. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3614>.
176. Hechtman JF, Sadowska J, Huse JT, Borsu L, Yaeger R, Shia J, et al. AKT1 E17K in Colorectal Carcinoma Is Associated with BRAF V600E but Not MSI-H Status: A Clinicopathologic Comparison to PIK3CA Helical and Kinase Domain Mutants. *Mol Cancer Res.* 2015 Jun;13(6):1003-8. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0062-T>.
177. van den Berg E, Storkel S. Kidney: Renal cell carcinoma. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2003;7(3):201-204.
178. Linehan WM. Genetic basis of kidney cancer: role of genomics for the development of disease-based therapeutics. *Genome Res.* 2012 Nov;22(11):2089-100.
179. Kim BJ, Kim JH, Kim HS, Zang DY. Prognostic and predictive value of VHL gene alteration in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review. *Oncotarget.* 2017 Feb 21;8(8):13979-13985.
180. Sanchez DJ, Simon MC. Genetic and metabolic hallmarks of clear cell renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018 Aug;1870(1):23-31.
181. Schödel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur Urol.* 2016 Apr;69(4):646-657.
182. Brugarolas J. PBRM1 and BAP1 as novel targets for renal cell carcinoma. *Cancer J.* 2013 Jul-Aug;19(4):324-32. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3182a102d1>.
183. Atkin NB. Significance of chromosome 5 and 17 changes in the development of carcinoma of the cervix uteri. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;91(1-4):44-6.
184. Kersemaekers AM, Kenter GG, Hermans J, Fleuren GJ, van de Vijver MJ. Allelic loss and prognosis in carcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer.* 1998 Aug 21;79(4):411-7.

185. Mitra AB. Genetic deletion and human papillomavirus infection in cervical cancer: loss of heterozygosity sites at 3p and 5p are important genetic events. *Int J Cancer*. 1999 Jul 30;82(3):322-4.
186. Femi OF. Genetic alterations and PIK3CA gene mutations and amplifications analysis in cervical cancer by racial groups in the United States. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2018 Jan-Feb;12(1):28-32.
187. Cardoso MFS, Castelletti CHM, Lima-Filho JL, Martins DBG, Teixeira JAC. Putative biomarkers for cervical cancer: SNVs, methylation and expression profiles. *Mutat Res*. 2017 Jul;773:161-173. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.06.002>.
188. Wijetunga NA, Belbin TJ, Burk RD, Whitney K, Abadi M, Grealley JM, Einstein MH, Schlecht NF. Novel epigenetic changes in CDKN2A are associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2016 Sep;142(3):566-73. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.07.006>.
189. Naseem A, Bhat ZI, Kalaiarasan P, Kumar B, Gandhi G, Rizvi MMA. Genetic and epigenetic alterations affecting PARK-2 expression in cervical neoplasm among North Indian patients. *Tumour Biol*. 2017 Jun;39(6):1010428317703635. <https://doi.org/10.1177/1010428317703635>.
190. Lee-Jones L, Williams T, Little E, Sampson J. Trisomy 14pter --> q21: a case with associated ovarian germ cell tumor and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2004 Jul 1;128A(1):78-84.
191. Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol*. 2000 Mar;16(3):567-76.
192. Shibuya Y, Tokunaga H, Saito S, Shimokawa K, Katsuoka F, Bin L, et al. Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018 Feb;57(2):51-60. <https://doi.org/10.1002/gcc.22507>.
193. Vanderstichele A, Busschaert P, Olbrecht S, Lambrechts D, Vergote I. Genomic signatures as predictive biomarkers of homologous recombination deficiency in

- ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2017 Nov;86:5-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.08.029>.
194. Leung DTH, Fuller PJ, Chu S. Impact of FOXL2 mutations on signaling in ovarian granulosa cell tumors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016 Mar;72:51-54. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.01.003>.
195. Anttonen M, Pihlajoki M, Andersson N, Georges A, L'hôte D, Vattulainen S, et al. FOXL2, GATA4, and SMAD3 co-operatively modulate gene expression, cell viability and apoptosis in ovarian granulosa cell tumor cells. *PLoS One*. 2014 Jan 9;9(1):e85545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085545>.
196. Bubancova I, Kovarikova H, Laco J, Ruszova E, Dvorak O, Palicka V, et al. Next-Generation Sequencing Approach in Methylation Analysis of HNF1B and GATA4 Genes: Searching for Biomarkers in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 22;18(2). pii: E474. <https://doi.org/10.3390/ijms18020474>.
197. Bai H, Cao D, Yang J, Li M, Zhang Z, Shen K. Genetic and epigenetic heterogeneity of epithelial ovarian cancer and the clinical implications for molecular targeted therapy. *J Cell Mol Med*. 2016 Apr;20(4):581-93. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12771>.
198. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. 2014 Jul;465(1):1-14. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>.
199. Rastelli F, Biancanelli S, Falzetta A, Martignetti A, Casi C, Bascioni R, et al. Triple-negative breast cancer: current state of the art. *Tumori*. 2010 Nov-Dec;96(6):875-88.
200. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2016 Sep;19(3):223-230.
201. Salameh A, Lee AK, Cardó-Vila M, Nunes DN, Efstathiou E, Staquicini FI, et al. PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 7;112(27):8403-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507882112>.

202. Poulos RC, Wong YT, Ryan R, Pang H, Wong JWH. Analysis of 7,815 cancer exomes reveals associations between mutational processes and somatic driver mutations. *PLoS Genet.* 2018 Nov 9;14(11):e1007779. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007779>.
203. Rübber A, Araujo A. Cancer heterogeneity: converting a limitation into a source of biologic information. *J Transl Med.* 2017 Sep 8;15(1):190. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1290-9>.
204. Ryu D, Joung JG, Kim NK, Kim KT, Park WY. Deciphering intratumor heterogeneity using cancer genome analysis. *Hum Genet.* 2016 Jun;135(6):635-42. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1670-x>.
205. Merid SK, Goranskaya D, Alexeyenko A. Distinguishing between driver and passenger mutations in individual cancer genomes by network enrichment analysis. *BMC Bioinformatics.* 2014 Sep 19;15:308. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-308>.
206. McFarland CD, Yaglom JA, Wojtkowiak JW, Scott JG, Morse DL, Sherman MY, et al. The Damaging Effect of Passenger Mutations on Cancer Progression. *Cancer Res.* 2017 Sep 15;77(18):4763-4772. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN15-3283T>.
207. Gomez K, Miura S, Huuki LA, Spell BS, Townsend JP, Kumar S. Somatic evolutionary timings of driver mutations. *BMC Cancer.* 2018 Jan 18;18(1):85. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3977-y>.
208. Song J, Peng W, Wang F. An Entropy-based method for identifying mutual exclusive driver genes in cancer. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* 2019 Feb 7. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2019.2897931>.
209. Raphael BJ, Dobson JR, Oesper L, Vandin F. Identifying driver mutations in sequenced cancer genomes: computational approaches to enable precision medicine. *Genome Med.* 2014 Jan 30;6(1):5. <https://doi.org/10.1186/gm524>.
210. Gao B, Zhao Y, Li Y, Liu J, Wang L, Li G, et al. Prediction of Driver Modules via Balancing Exclusive Coverages of Mutations in Cancer Samples. *Adv Sci (Weinh).* 2018 Dec 18;6(4):1801384. <https://doi.org/10.1002/advs.201801384>.

211. Cheng F, Zhao J, Zhao Z. Advances in computational approaches for prioritizing driver mutations and significantly mutated genes in cancer genomes. *Brief Bioinform.* 2016 Jul;17(4):642-56. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv068>.
212. Hou Y, Gao B, Li G, Su Z. MaxMIF: A New Method for Identifying Cancer Driver Genes through Effective Data Integration. *Adv Sci (Weinh).* 2018 Jul 23;5(9):1800640. <https://doi.org/10.1002/advs.201800640>.
213. Bii VM, Trobridge GD. Identifying Cancer Driver Genes Using Replication-Incompetent Retroviral Vectors. *Cancers (Basel).* 2016 Oct 25;8(11). pii: E99.
214. Bii VM, Collins CP, Hocum JD, Trobridge GD. Replication-incompetent gammaretroviral and lentiviral vector-based insertional mutagenesis screens identify prostate cancer progression genes. *Oncotarget.* 2018 Feb 15;9(21):15451-15463. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24503>.
215. Poon SL, McPherson JR, Tan P, Teh BT, Rozen SG. Mutation signatures of carcinogen exposure: genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. *Genome Med.* 2014 Mar 31;6(3):24. <https://doi.org/10.1186/gm541>.
216. Phillips DH. Mutational spectra and mutational signatures: Insights into cancer aetiology and mechanisms of DNA damage and repair. *DNA Repair (Amst).* 2018 Nov;71:6-11. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.003>.
217. Harris RS. Cancer mutation signatures, DNA damage mechanisms, and potential clinical implications. *Genome Med.* 2013 Sep 27;5(9):87. <https://doi.org/10.1186/gm490>.
218. Perduca V, Omichessan H, Baglietto L, Severi G. Mutational and epigenetic signatures in cancer tissue linked to environmental exposures and lifestyle. *Curr Opin Oncol.* 2018 Jan;30(1):61-67. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000418>.
219. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci.* 2016 Jul;41(7):578-594. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.001>.
220. Adolph MB, Love RP, Feng Y, Chelico L. Enzyme cycling contributes to efficient induction of genome mutagenesis by the cytidine deaminase APOBEC3B.

- Nucleic Acids Res. 2017 Nov 16;45(20):11925-11940. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx832>.
221. Shi K, Carpenter MA, Banerjee S, Shaban NM, Kurahashi K, Salamango DJ, et al. Structural basis for targeted DNA cytosine deamination and mutagenesis by APOBEC3A and APOBEC3B. *Nat Struct Mol Biol.* 2017 Feb;24(2):131-139. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3344>.
222. Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:3-25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1.
223. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2012 Apr;81(4):303-11. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x>.
224. Fardi M, Solali S, Farshdousti Hagh M. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes Dis.* 2018 Jun 18;5(4):304-311. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.06.003>.
225. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics.* 2009 Dec;1(2):239-59. <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>.
226. Hatziapostolou M, Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011 May;68(10):1681-702. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0624-z>
227. Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):461-7.
228. Qin W, Wolf P, Liu N, Link S, Smets M, La Mastra F, et al. DNA methylation requires a DNMT1 ubiquitin interacting motif (UIM) and histone ubiquitination. *Cell Res.* 2015 Aug;25(8):911-29. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.72>
229. Walton EL, Francastel C, Velasco G. Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics.* 2011 Nov;6(11):1373-7. <https://doi.org/10.4161/epi.6.11.17978>.
230. Jeltsch A, Jurkowska RZ. New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem Sci.* 2014 Jul;39(7):310-8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.002>.
231. Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays.* 2001 Dec;23(12):1131-7.

232. Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. 2015;7(6):1051-73. <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>.
233. Chen YC, Gotea V, Margolin G, Elnitski L. Significant associations between driver gene mutations and DNA methylation alterations across many cancer types. *PLoS Comput Biol*. 2017 Nov 10;13(11):e1005840. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005840>
234. Saghafeinia S, Mina M, Riggi N, Hanahan D, Ciriello G. Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. *Cell Rep*. 2018 Oct 23;25(4):1066-1080.e8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.082>
235. Spainhour JC, Lim HS, Yi SV, Qiu P. Correlation Patterns Between DNA Methylation and Gene Expression in The Cancer Genome Atlas. *Cancer Inform*. 2019 Feb 11;18:1176935119828776. <https://doi.org/10.1177/1176935119828776>.
236. Hughes LA, Khalid-de Bakker CA, Smits KM, van den Brandt PA, Jonkers D, Ahuja N, et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):77-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.005>.
237. Hughes LA, Melotte V, de Schrijver J, de Maat M, Smit VT, Bovée JV, et al. The CpG island methylator phenotype: what's in a name? *Cancer Res*. 2013 Oct 1;73(19):5858-68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4306>.
238. Fang F, Turcan S, Rimner A, Kaufman A, Giri D, Morris LG, et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci Transl Med*. 2011 Mar 23;3(75):75ra25. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001875>.
239. Oue N, Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Yoshida K, Matsusaki K, et al. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histological type and CpG island methylator phenotype. *Cancer Sci*. 2003 Oct;94(10):901-5.
240. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010 May 18;17(5):510-22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.017>.

241. Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H, et al. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2012 Aug;33(8):1487-93. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs177>.
242. Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MF, Morton DL, et al. CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 1;15(5):1801-7. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1361>.
243. Suzuki H, Yamamoto E, Maruyama R, Niinuma T, Kai M. Biological significance of the CpG island methylator phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1-2):35-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.007>.
244. Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett*. 2008 Sep 18;268(2):177-86. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.022>.
245. Biswas S, Rao CM. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther*. 2017 May;173:118-134. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>
246. Ramakrishnan V. Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1997;26:83-112.
247. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
248. du Preez LL, Patterton HG. The effect of epigenetic modifications on the secondary structures and possible binding positions of the N-terminal tail of histone H3 in the nucleosome: a computational study. *J Mol Model*. 2017 Apr;23(4):137. <https://doi.org/10.1007/s00894-017-3308-x>.
249. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):41-5.
250. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Apr 1;8(4):a019521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>.

251. Wang R, Xin M, Li Y, Zhang P, Zhang M. The Functions of Histone Modification Enzymes in Cancer. *Curr Protein Pept Sci*. 2016;17(5):438-45.
252. Shin DG, Bayarsaihan D. A Novel Epi-drug Therapy Based on the Suppression of BET Family Epigenetic Readers. *Yale J Biol Med*. 2017 Mar 29;90(1):63-71.
253. Mio C, Bulotta S, Russo D, Damante G. Reading Cancer: Chromatin Readers as Druggable Targets for Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. 2019 Jan 9;11(1). pii: E61. <https://doi.org/10.3390/cancers11010061>.
254. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009 Jun;8(6):1409-20. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0860>.
255. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007 Aug 13;26(37):5541-52.
256. Negmeldin AT, Knoff JR, Pflum MKH. The structural requirements of histone deacetylase inhibitors: C4-modified SAHA analogs display dual HDAC6/HDAC8 selectivity. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan 1;143:1790-1806. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.076>.
257. De Vreese R, D'hooghe M. Synthesis and applications of benzohydroxamic acid-based histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2017 Jul 28;135:174-195. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.013>
258. Shin DG, Bayarsaihan D. A Novel Epi-drug Therapy Based on the Suppression of BET Family Epigenetic Readers. *Yale J Biol Med*. 2017 Mar 29;90(1):63-71.
259. Miranda-Gonçalves V, Lameirinhas A, Henrique R, Jerónimo C. Metabolism and Epigenetic Interplay in Cancer: Regulation and Putative Therapeutic Targets. *Front Genet*. 2018 Oct 9;9:427. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00427>.
260. Santosh B, Varshney A, Yadava PK. Non-coding RNAs: biological functions and applications. *Cell Biochem Funct*. 2015 Jan;33(1):14-22. <https://doi.org/10.1002/cbf.3079>.
261. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*. 2011 Jun 1;90(3):430-40. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr097>.

262. Nahkuri S, Paro R. The role of noncoding RNAs in chromatin regulation during differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012 Sep-Oct;1(5):743-52. <https://doi.org/10.1002/wdev.41>.
263. Chen J, Xue Y. Emerging roles of non-coding RNAs in epigenetic regulation. *Sci China Life Sci.* 2016 Mar;59(3):227-35. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5010-0>.
264. Klinge CM. Non-Coding RNAs in Breast Cancer: Intracellular and Intercellular Communication. *Noncoding RNA.* 2018 Dec 12;4(4). pii: E40. <https://doi.org/10.3390/ncrna4040040>.
265. Vallone C, Rigon G, Gulia C, Baffa A, Votino R, Morosetti G, et al. Non-Coding RNAs and Endometrial Cancer. *Genes (Basel).* 2018 Mar 29;9(4). pii: E187. <https://doi.org/10.3390/genes9040187>.
266. Yamamura S, Imai-Sumida M, Tanaka Y, Dahiya R. Interaction and cross-talk between non-coding RNAs. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Feb;75(3):467-484. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2626-6>.
267. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011 Nov 18;12(12):861-74. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>.
268. Singh NK. miRNAs target databases: developmental methods and target identification techniques with functional annotations. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Jun;74(12):2239-2261. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2469-1>.
269. Anastasiadou E, Jacob LS, Slack FJ. Non-coding RNA networks in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018 Jan;18(1):5-18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>.
270. Forrest ME, Khalil AM. Review: Regulation of the cancer epigenome by long non-coding RNAs. *Cancer Lett.* 2017 Oct 28;407:106-112. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.03.040>.
271. Kondo Y, Shinjo K, Katsushima K. Long non-coding RNAs as an epigenetic regulator in human cancers. *Cancer Sci.* 2017 Oct;108(10):1927-1933. <https://doi.org/10.1111/cas.13342>.

272. Zhou Z, Lin Z, Pang X, Tariq MA, Ao X, Li P, et al. Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017 Dec 16;9(27):19443-19458. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23821>.
273. Carrer A, Wellen KE. Metabolism and epigenetics: a link cancer cells exploit. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Aug;34:23-9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.012>
274. Montellier E, Gaucher J. Targeting the interplay between metabolism and epigenetics in cancer. *Curr Opin Oncol*. 2019 Mar;31(2):92-99. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000501>
275. Tran TQ, Lowman XH, Kong M. Molecular Pathways: Metabolic Control of Histone Methylation and Gene Expression in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug 1;23(15):4004-4009. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2506>
276. McCullough LE, Chen J, Cho YH, Khankari NK, Bradshaw PT, White AJ, et al. Modification of the association between recreational physical activity and survival after breast cancer by promoter methylation in breast cancer-related genes. *Breast Cancer Res*. 2017 Feb 21;19(1):19. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0811-z>.
277. Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3077-80; discussion 3080. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3293>.
278. Bellovin DI, Das B, Felsher DW. Tumor dormancy, oncogene addiction, cellular senescence, and self-renewal programs. *Adv Exp Med Biol*. 2013;734:91-107. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1445-2_6.
279. Shen J, Li L, Yang T, Cheng N, Sun G. Drug Sensitivity Screening and Targeted Pathway Analysis Reveal a Multi-Driver Proliferative Mechanism and Suggest a Strategy of Combination Targeted Therapy for Colorectal Cancer Cells. *Molecules*. 2019 Feb 11;24(3). pii: E623. <https://doi.org/10.3390/molecules24030623>.
280. Casey SC, Li Y, Felsher DW. An essential role for the immune system in the mechanism of tumor regression following targeted oncogene inactivation. *Immunol Res*. 2014 May;58(2-3):282-91. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8503-6>.
281. Koutsimpelas D, Pongsapich W, Heinrich U, Mann S, Mann WJ, Brieger J. Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in

- head and neck squamous cell carcinoma: pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012 Apr;27(4):1135-41. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1624>.
282. Fukushige S, Kondo E, Horii A. Methyl-CpG targeted transcriptional activation allows re-expression of tumor suppressor genes in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Dec 12;377(2):600-605. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.016>.
283. Lin HY, Kuo YC, Weng YI, Lai IL, Huang TH, Lin SP, et al. Activation of silenced tumor suppressor genes in prostate cancer cells by a novel energy restriction-mimetic agent. *Prostate.* 2012 Dec 1;72(16):1767-78. <https://doi.org/10.1002/pros.22530>.
284. Gupta A, Shah K, Oza MJ, Behl T. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: A novel therapy for cancer treatment. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109:484-492. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.155>.
285. Kazanets A, Shorstova T, Hilmi K, Marques M, Witcher M. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1865(2):275-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.04.001>.
286. Protopopov A, Kashuba V, Zabarovska VI, Muravenko OV, Lerman MI, Klein G, et al. An integrated physical and gene map of the 3.5-Mb chromosome 3p21.3 (AP20) region implicated in major human epithelial malignancies. *Cancer Res.* 2003 Jan 15;63(2):404-12.
287. Rimessi P, Gualandi F, Morelli C, Trabanelli C, Wu Q, Possati L, et al. Transfer of human chromosome 3 to an ovarian carcinoma cell line identifies three regions on 3p involved in ovarian cancer. *Oncogene.* 1994 Dec;9(12):3467-74.
288. Lee TG, Jeong EH, Kim SY, Kim HR, Kim H, Kim CH. Fhit, a tumor suppressor protein, induces autophagy via 14-3-3 τ in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2017 May 9;8(19):31923-31937. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16652>.

289. Schrock MS, Karras JR, Guggenbiller MJ, Druck T, Batar B, Huebner K. Fhit and Wwox loss-associated genome instability: A genome caretaker one-two punch. *Adv Biol Regul.* 2017 Jan;63:167-176. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.09.008>.
290. Waters CE, Saldivar JC, Hosseini SA, Huebner K. The FHIT gene product: tumor suppressor and genome "caretaker". *Cell Mol Life Sci.* 2014 Dec;71(23):4577-87. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1722-0>.
291. Kaelin WG Jr. The VHL Tumor Suppressor Gene: Insights into Oxygen Sensing and Cancer. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2017;128:298-307.
292. Gossage L, Eisen T, Maher ER. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jan;15(1):55-64. <https://doi.org/10.1038/nrc3844>.
293. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993 May 28;260(5112):1317-20.
294. Hou PZ, Jian G, Ma ZQ, Xu Y. Correlation between RAR- β expression in lung squamous cell carcinoma tissues and prognosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Oct;21(19):4304-4310.
295. Hua F, Fang N, Li X, Zhu S, Zhang W, Gu J. A meta-analysis of the relationship between RAR β gene promoter methylation and non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2014 May 5;9(5):e96163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096163>.
296. Virmani AK, Rathi A, Zöchbauer-Müller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16;92(16):1303-7.
297. Senchenko VN, Liu J, Loginov W, Bazov I, Angeloni D, Seryogin Y, et al. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene.* 2004 Jul 29;23(34):5719-28.
298. Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, et al. The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7504-9.

299. Kondo M, Ji L, Kamibayashi C, Tomizawa Y, Randle D, Sekido Y, et al. Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells. *Oncogene*. 2001 Sep 27;20(43):6258-62.
300. Kashuba VI, Li J, Wang F, Senchenko VN, Protopopov A, Malyukova A, et al. RBSP3 (HYA22) is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 6;101(14):4906-11.
301. Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 7;21(45):6915-35.
302. Wang F, Grigorieva EV, Li J, Senchenko VN, Pavlova TV, Anedchenko EA, et al. HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not *in vitro*. *PLoS One*. 2008 Aug 22;3(8):e3031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003031>.
303. Schott S, Yang R, Stöcker S, Canzian F, Giese N, Bugert P, et al. HYAL2 methylation in peripheral blood as a potential marker for the detection of pancreatic cancer: a case control study. *Oncotarget*. 2017 Jun 27;8(40):67614-67625. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18757>.
304. Mendez P, Ramirez JL. Copy number gains of FGFR1 and 3q chromosome in squamous cell carcinoma of the lung. *Transl Lung Cancer Res*. 2013 Apr;2(2):101-11. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2013.03.05>.
305. Davidson MA, Shanks EJ. 3q26-29 Amplification in head and neck squamous cell carcinoma: a review of established and prospective oncogenes. *FEBS J*. 2017 Sep;284(17):2705-2731. <https://doi.org/10.1111/febs.14061>.
306. Fields AP, Justilien V, Murray NR. The chromosome 3q26 OncCassette: A multigenic driver of human cancer. *Adv Biol Regul*. 2016 Jan;60:47-63. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.009>.
307. Zhang X, Li HM, Liu Z, Zhou G, Zhang Q, Zhang T, et al. Loss of heterozygosity and methylation of multiple tumor suppressor genes on chromosome 3 in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2013 Jan;48(1):132-43. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0621-0>.

308. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, et al. Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-beta, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3724-8.
309. Choi CH, Lee KM, Choi JJ, Kim TJ, Kim WY, Lee JW, et al. Hypermethylation and loss of heterozygosity of tumor suppressor genes on chromosome 3p in cervical cancer. *Cancer Lett.* 2007 Sep 18;255(1):26-33.
310. Morrissey C, Martinez A, Zatyka M, Agathangelou A, Honorio S, Astuti D, et al. Epigenetic inactivation of the RASSF1A 3p21.3 tumor suppressor gene in both clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7277-81.
311. Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, et al. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2002 Aug;38(12):1585-92.
312. Kutsenko AS, Gizatullin RZ, Al-Amin AN, Wang F, Kvasha SM, Podowski RM, et al. NotI flanking sequences: a tool for gene discovery and verification of the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3163-70.
313. Li J, Protopopov A, Wang F, Senchenko V, Petushkov V, Vorontsova O, et al. NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16):10724-9.
314. Senchenko VN, Kisseljova NP, Ivanova TA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, et al. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics.* 2013 Apr;8(4):409-20. <https://doi.org/10.4161/epi.24233>.
315. Kondratov AG, Kvasha SM, Stoliar LA, Romanenko AM, Zgonnyk YM, Gordiyuk VV, et al. Alterations of the WNT7A gene in clear cell renal cell carcinomas. *PLoS One.* 2012;7(10):e47012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047012>.

316. Haraldson K, Kashuba VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Kudryavtseva AV, Pavlova TV, et al. LRRC3B gene is frequently epigenetically inactivated in several epithelial malignancies and inhibits cell growth and replication. *Biochimie*. 2012 May;94(5):1151-7. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.019>.
317. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jan 12;23(1):27-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
318. Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Oct 6;34:111. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y>.
319. Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep*. 2015 Apr;42(4):841-51. <https://doi.org/10.1007/s11033-015-3858-x>.
320. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans*. 2016 Oct 15;44(5):1499-1505.
321. Tekade RK, Sun X. The Warburg effect and glucose-derived cancer theranostics. *Drug Discov Today*. 2017 Nov;22(11):1637-1653. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.08.003>.
322. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *Int J Radiat Biol*. 2019 Mar 1:1-8. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>.
323. Jena A, Taneja S, Negi P, Singh A, Kumar C, Kumar V. A Practical Approach to Optimize Scan Protocol for Simultaneous Whole-Body Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging in Cancer Staging. *Indian J Nucl Med*. 2018 Oct-Dec;33(4):295-301. https://doi.org/10.4103/ijnm.IJNM_55_18.
324. Taralli S, Sollini M, Milella M, Perotti G, Filice A, Menga M, et al. (18)F-FDG and (68)Ga-somatostatin analogs PET/CT in patients with Merkel cell carcinoma: a comparison study. *EJNMMI Res*. 2018 Jul 21;8(1):64. <https://doi.org/10.1186/s13550-018-0423-3>.

325. Gentric G, Mieulet V, Mechta-Grigoriou F. Heterogeneity in Cancer Metabolism: New Concepts in an Old Field. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Mar 20;26(9):462-485. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6750>.
326. Kim SY. Cancer Energy Metabolism: Shutting Power off Cancer Factory. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018 Jan 1;26(1):39-44. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.184>.
327. Hamanaka RB, Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med*. 2012 Feb 13;209(2):211-5. <https://doi.org/10.1084/jem.20120162>.
328. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol*. 2016 Jan 20;14(1):15. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0769-9>.
329. Guerra F, Arbin AA, Moro L. Mitochondria and cancer chemoresistance. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2017 Aug;1858(8):686-699. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.012>.
330. Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 May;1042:109-22.
331. Cook CC, Kim A, Terao S, Gotoh A, Higuchi M. Consumption of oxygen: a mitochondrial-generated progression signal of advanced cancer. *Cell Death Dis*. 2012 Jan 19;3:e258. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.141>.
332. Marbaniang C, Kma L. Dysregulation of Glucose Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors in Cancer Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Sep 26;19(9):2377-2390.
333. Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):191-8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.004>.
334. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab*. 2017 Jan 10;25(1):27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.009>.

335. Monaco ME. Fatty acid metabolism in breast cancer subtypes. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):29487-29500. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15494>.
336. Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jan;73(2):377-92. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2070-4>.
337. Tang L, Wei F, Wu Y, He Y, Shi L, Xiong F, et al. Role of metabolism in cancer cell radioresistance and radiosensitization methods. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Apr 23;37(1):87. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0758-7>.
338. Wang Y, Bai C, Ruan Y, Liu M, Chu Q, Qiu L, et al. Coordinative metabolism of glutamine carbon and nitrogen in proliferating cancer cells under hypoxia. *Nat Commun*. 2019 Jan 14;10(1):201. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08033-9>.
339. Corbet C, Feron O. Metabolic and mind shifts: from glucose to glutamine and acetate addictions in cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015 Jul;18(4):346-53. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000178>.
340. Tardito S, Oudin A, Ahmed SU, Fack F, Keunen O, Zheng L, et al. Glutamine synthetase activity fuels nucleotide biosynthesis and supports growth of glutamine-restricted glioblastoma. *Nat Cell Biol*. 2015 Dec;17(12):1556-68. <https://doi.org/10.1038/ncb3272>.
341. Cox AG, Hwang KL, Brown KK, Evason K, Beltz S, Tsomides A, et al. Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth. *Nat Cell Biol*. 2016 Aug;18(8):886-896. <https://doi.org/10.1038/ncb3389>.
342. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):521-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
343. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 1;1514(2):291-302.
344. Cormerais Y, Massard PA, Vucetic M, Giuliano S, Tambutté E, Durivault J, et al. The glutamine transporter ASCT2 (SLC1A5) promotes tumor growth

- independently of the amino acid transporter LAT1 (SLC7A5). *J Biol Chem*. 2018 Feb 23;293(8):2877-2887. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001342>.
345. Mathur D, Stratikopoulos E, Ozturk S, Steinbach N, Pegno S, Schoenfeld S, et al. PTEN Regulates Glutamine Flux to Pyrimidine Synthesis and Sensitivity to Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibition. *Cancer Discov*. 2017 Apr;7(4):380-390. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0612>.
346. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 2;105(48):18782-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810199105>.
347. Xu X, Li J, Sun X, Guo Y, Chu D, Wei L, et al. Tumor suppressor NDRG2 inhibits glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer cells by repressing c-Myc expression. *Oncotarget*. 2015 Sep 22;6(28):26161-76. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4544>.
348. Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature*. 2013 Apr 4;496(7443):101-5. <https://doi.org/10.1038/nature12040>.
349. Lukey MJ, Wilson KF, Cerione RA. Therapeutic strategies impacting cancer cell glutamine metabolism. *Future Med Chem*. 2013 Sep;5(14):1685-700. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.130>.
350. Lukey MJ, Katt WP, Cerione RA. Targeting amino acid metabolism for cancertherapy. *Drug Discov Today*. 2017 May;22(5):796-804. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.12.003>.
351. Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):191-8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.004>.
352. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer*. 2013 Aug;13(8):572-83. <https://doi.org/10.1038/nrc3557>.
353. Locasale JW, Cantley LC. Genetic selection for enhanced serine metabolism in cancer development. *Cell Cycle*. 2011 Nov 15;10(22):3812-3. <https://doi.org/>

10.4161/cc.10.22.18224.

354. Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, et al. Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Jan;50(1):1-12. <https://doi.org/10.1002/gcc.20826>.
355. Newman AC, Maddocks ODK. One-carbon metabolism in cancer. *Br J Cancer*. 2017 Jun 6;116(12):1499-1504. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.118>.
356. Labuschagne CF, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep*. 2014 May 22;7(4):1248-58. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.045>.
357. Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. *J Cell Biol*. 2016 Aug 1;214(3):249-57. <https://doi.org/10.1083/jcb.201604085>.
358. Konno M, Asai A, Kawamoto K, Nishida N, Satoh T, Doki Y, et al. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer (Review). *Int J Oncol*. 2017 Apr;50(4):1057-1063. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3885>.
359. Shuvalov O, Petukhov A, Daks A, Fedorova O, Vasileva E, Barlev NA. One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget*. 2017 Apr 4;8(14):23955-23977. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15053>.
360. Jo Y, Okazaki H, Moon YA, Zhao T. Regulation of Lipid Metabolism and Beyond. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:5415767. <https://doi.org/10.1155/2016/5415767>.
361. Brault C, Schulze A. The Role of Glucose and Lipid Metabolism in Growth and Survival of Cancer Cells. *Recent Results Cancer Res*. 2016;207:1-22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42118-6_1.

362. Cheng C, Geng F, Cheng X, Guo D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2018 May 21;38(1):27. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0301-4>.
363. Beloribi-Djefafia S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. 2016 Jan 25;5:e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>.
364. Santi A, Caselli A, Ranaldi F, Paoli P, Mugnaioni C, Michelucci E, et al. Cancer associated fibroblasts transfer lipids and proteins to cancer cells through cargo vesicles supporting tumor growth. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Dec;1853(12):3211-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.013>.
365. Ashida S, Kawada C, Inoue K. Stromal regulation of prostate cancer cell growth by mevalonate pathway enzymes HMGCS1 and HMGCR. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):6533-6542. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7025>.
366. Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, et al. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Jul;43(7):1045-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.023>.
367. Galbraith L, Leung HY, Ahmad I. Lipid pathway deregulation in advanced prostate cancer. *Pharmacol Res*. 2018 May;131:177-184. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.022>.
368. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res*. 2015 Feb 20;8:105-18. <https://doi.org/10.2147/JPR.S75160>.
369. Dutta A, Sharma-Walia N. Curbing Lipids: Impacts ON Cancer and Viral Infection. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 2;20(3). pii: E644. <https://doi.org/10.3390/ijms20030644>.
370. Iannelli F, Lombardi R, Milone MR, Pucci B, De Rienzo S, Budillon A, et al. Targeting Mevalonate Pathway in Cancer Treatment: Repurposing of Statins. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2018;13(2):184-200. <https://doi.org/10.2174/1574892812666171129141211>.

371. Mollinedo F, Gajate C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv Biol Regul.* 2015 Jan;57:130-46. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.003>.
372. Luo X, Cheng C, Tan Z, Li N, Tang M, Yang L, et al. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2017 Apr 11;16(1):76. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0646-3>.
373. Jahn KA, Su Y, Braet F. Multifaceted nature of membrane microdomains in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2011 Feb 14;17(6):681-90. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i6.681>.
374. Chiarugi P, Cirri P. Metabolic exchanges within tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 2016 Sep 28;380(1):272-80. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.027>.
375. Guido C, Whitaker-Menezes D, Capparelli C, Balliet R, Lin Z, Pestell RG, et al. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by TGF- β drives tumor growth: connecting TGF- β signaling with "Warburg-like" cancer metabolism and L-lactate production. *Cell Cycle.* 2012 Aug 15;11(16):3019-35. <https://doi.org/10.4161/cc.21384>.
376. Sormendi S, Wielockx B. Hypoxia Pathway Proteins As Central Mediators of Metabolism in the Tumor Cells and Their Microenvironment. *Front Immunol.* 2018 Jan 29;9:40. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00040>.
377. Goetze K, Walenta S, Ksiazkiewicz M, Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W. Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol.* 2011 Aug;39(2):453-63. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1055>.
378. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 2014 Sep 25;513(7519):559-63. <https://doi.org/10.1038/nature13490>.
379. Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res.* 2017 Jul 15;356(2):116-121. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.008>.

380. Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Végran F, Verrax J, Kennedy KM, et al. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033418>.
381. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(10):1319-30.
382. Li F, Zhang R, Li S, Liu J. IDO1: An important immunotherapy target in cancer treatment. *Int Immunopharmacol*. 2017 Jun;47:70-77. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.03.024>.
383. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
384. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Feb;20(2):69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>.
385. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010 Jun;15(2):117-34. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>.
386. Hiew MSY, Cheng HP, Huang CJ, Chong KY, Cheong SK, Choo KB, et al. Incomplete cellular reprogramming of colorectal cancer cells elicits an epithelial/mesenchymal hybrid phenotype. *J Biomed Sci*. 2018 Jul 19;25(1):57. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0461-1>.
387. Nakaya Y, Sheng G. Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev Growth Differ*. 2008 Dec;50(9):755-66. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01070.x>.
388. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*. 2005 Jul;233(3):706-20.

389. Font-Clos F, Zapperi S, La Porta CAM. Topography of epithelial-mesenchymal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):5902-5907. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722609115>.
390. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):75-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.002>.
391. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):563-72.
392. Lee HM, Hwang KA, Choi KC. Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects of endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Dec 5;457:103-113. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.026>.
393. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*. 2010 Feb;101(2):293-9. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01419.x>.
394. Ribatti D. Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis. *Exp Cell Res*. 2017 Apr 1;353(1):1-5. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.041>.
395. Huang R, Zong X. Aberrant cancer metabolism in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis: Mechanisms in cancer progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Jul;115:13-22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.04.005>.
396. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1429-37. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>.
397. Weber CE, Li NY, Wai PY, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, TGF- β , and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. *J Burn Care Res*. 2012 May-Jun;33(3):311-8. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e318240541e>.

398. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, et al. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):495-506. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2464-0>.
399. Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Zhou Y, Han W, et al. Epithelial-mesenchymal transition: An emerging target in tissue fibrosis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016 Jan;241(1):1-13. <https://doi.org/10.1177/1535370215597194>.
400. Rybinski B, Franco-Barraza J, Cukierman E. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol Genomics.* 2014 Apr 1;46(7):223-44. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00158.2013>.
401. Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ. Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem.* 2007 Jul 1;101(4):830-9.
402. Jing Y, Han Z, Zhang S, Liu Y, Wei L. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci.* 2011 Aug 31;1:29. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-1-29>.
403. Li H, Xu F, Li S, Zhong A, Meng X, Lai M. The tumor microenvironment: An irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal transition-mediated cancer metastasis. *Cell Adh Migr.* 2016 Jul 3;10(4):434-46. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1129481>.
404. Liu X, Yun F, Shi L, Li ZH, Luo NR, Jia YF. Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(15):6201-6.
405. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions during cancer progression. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2007;91:21-8.
406. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Mar;15(3):178-96. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.
407. Oh KY, Yoon HJ, Lee JI, Ahn SH, Hong SD. Twist and Snail expression in tumor and stromal cells of epithelial odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2017 Feb;46(2):127-133. <https://doi.org/10.1111/jop.12479>.

408. Goossens S, Vandamme N, Van Vlierberghe P, Berx G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2017 Dec;1868(2):584-591. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.06.006>.
409. Göppel J, Möckelmann N, Münscher A, Sauter G, Schumacher U. Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulating Transcription Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Res*. 2017 Oct;37(10):5435-5440.
410. Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2):117-36.
- 411 Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem*. 2008 Jun 1;104(3):733-44. <https://doi.org/10.1002/jcb.21695>.
412. Shao B, Bjaanæs MM, Helland Å, Schütte C, Conrad T. EMT network-based feature selection improves prognosis prediction in lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2019 Jan 31;14(1):e0204186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204186>.
413. Zhao M, Kong L, Liu Y, Qu H. dbEMT: an epithelial-mesenchymal transition associated gene resource. *Sci Rep*. 2015 Jun 23;5:11459. <https://doi.org/10.1038/srep11459>.
414. Zhao Z, Zhou W, Han Y, Peng F, Wang R, Yu R, et al. EMT-Regulome: a database for EMT-related regulatory interactions, motifs and network. *Cell Death Dis*. 2017 Jun 15;8(6):e2872. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.267>.
415. Tretbar S, Krausbeck P, Müller A, Friedrich M, Vaxevanis C, Bukur J, et al. TGF- β inducible epithelial-to-mesenchymal transition in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2019 Feb 19;10(15):1507-1524. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26682>.
416. Saitoh M. Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor- β signaling during tumor progression. *Cancer Sci*. 2015 May;106(5):481-8. <https://doi.org/10.1111/cas.12630>.

417. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*. 2013 Jan;25(1):76-84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>.
418. Lo UG, Lee CF, Lee MS, Hsieh JT. The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2017 Sep 30;18(10). pii: E2079. <https://doi.org/10.3390/ijms18102079>
419. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Aggressive Lung Cancers. *Adv Exp Med Biol*. 2016;890:37-56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24932-2_3.
420. Kong FF, Qu ZQ, Yuan HH, Wang JY, Zhao M, Guo YH, et al. Overexpression of FOXM1 is associated with EMT and is a predictor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2014 Jun;31(6):2660-8. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3129>.
421. Meng FD, Wei JC, Qu K, Wang ZX, Wu QF, Tai MH, et al. FoxM1 overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2015 Jan 7;21(1):196-213. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.196>.
422. Tang X, Zha L, Li H, Liao G, Huang Z, Peng X, et al. Upregulation of GNL3 expression promotes colon cancer cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncol Rep*. 2017 Oct;38(4):2023-2032. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5923>.
423. Deng J, Wang L, Chen H, Hao J, Ni J, Chang L, et al. Targeting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells for chemoresistant ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):55771-55788. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9908>.
424. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, et al. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*. 2009 Sep;27(9):2059-68. <https://doi.org/10.1002/stem.154>.
425. Yue P, Zhang X, Paladino D, Sengupta B, Ahmad S, Holloway RW, et al. Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-

- forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2012 May 3;31(18):2309-22. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.409>.
426. Marchini S, Fruscio R, Clivio L, Beltrame L, Porcu L, Fuso Nerini I, et al. Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2013 Jan;49(2):520-30. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.06.026>.
427. Gupta N, Xu Z, El-Sehemy A, Steed H, Fu Y. Notch3 induces epithelial-mesenchymal transition and attenuates carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2013 Jul;130(1):200-6. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.03.019>.
428. Skrypek N, Goossens S, De Smedt E, Vandamme N, Berx G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet*. 2017 Dec;33(12):943-959. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.004>.
429. Peixoto P, Etcheverry A, Aubry M, Missey A, Lachat C, Perrard J, et al. EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 27;10(3):205. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1397-4>.
430. Sun L, Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Dec;73(23):4493-4515.
431. Lee JY, Kong G. Roles and epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors in cancer initiation and progression. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Dec;73(24):4643-4660
432. Dong C, Wu Y, Yao J, Wang Y, Yu Y, Rychahou PG, et al. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1469-86. <https://doi.org/10.1172/JCI57349>.
433. Fukagawa A, Ishii H, Miyazawa K, Saitoh M. δ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Med*. 2015 Jan;4(1):125-35. <https://doi.org/10.1002/cam4.347>.
434. Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA. The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in

- breast cancer. PLoS One. 2011;6(10):e26514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026514>.
435. Byles V, Zhu L, Lovaas JD, Chmielewski LK, Wang J, Faller DV, et al. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene*. 2012 Oct 25;31(43):4619-29. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.612>.
436. Roche J, Nasarre P, Gemmill R, Baldys A, Pontis J, Korch C, et al. Global Decrease of Histone H3K27 Acetylation in ZEB1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2013 Apr 3;5(2):334-56. <https://doi.org/10.3390/cancers5020334>.
437. Fu J, Qin L, He T, Qin J, Hong J, Wong J, et al. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res*. 2011 Feb;21(2):275-89. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.118>.
438. Sun X, Liu Y. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway may contribute to cervical cancer pathogenesis via upregulation of Twist. *Oncol Lett*. 2017 Oct;14(4):4841-4844. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6754>.
439. Wang JQ, Wu KJ. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by hypoxia in cancer: targets and therapy. *Curr Pharm Des*. 2015;21(10):1272-8.
440. Sekhon K, Bucay N, Majid S, Dahiya R, Saini S. MicroRNAs and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Oct 11;7(41):67597-67611. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11708>.
441. Abba ML, Patil N, Leupold JH, Allgayer H. MicroRNA Regulation of Epithelial to Mesenchymal Transition. *J Clin Med*. 2016 Jan 14;5(1). pii: E8. <https://doi.org/10.3390/jcm5010008>.
442. Brabletz S, Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep*. 2010 Sep;11(9):670-7. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.117>.
443. Hill L, Browne G, Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer*. 2013 Feb 15;132(4):745-54. <https://doi.org/10.1002/ijc.27708>.

444. Qiu G, Lin Y, Zhang H, Wu D. miR-139-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting ZEB1 and ZEB2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jul 31;463(3):315-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.062>.
445. Majid S, Dar AA, Saini S, Deng G, Chang I, Greene K, et al. MicroRNA-23b functions as a tumor suppressor by regulating Zeb1 in bladder cancer. *PLoS One*. 2013 Jul 2;8(7):e67686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067686>.
446. Kim NH, Kim HS, Li XY, Lee I, Choi HS, Kang SE, et al. A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2011 Oct 31;195(3):417-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.201103097>.
447. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jul;73(13):2491-509. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2174-5>.
448. Li C, Lu L, Feng B, Zhang K, Han S, Hou D, et al. The lincRNA-ROR/miR-145 axis promotes invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma via induction of epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB2. *Sci Rep*. 2017 Jul 5;7(1):4637. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04113-w>.
449. Pan Y, Chen J, Tao L, Zhang K, Wang R, Chu X, et al. Long noncoding RNA ROR regulates chemoresistance in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma cells via epithelial mesenchymal transition pathway. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):33144-33158. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16562>.
450. Ørom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell*. 2010 Oct 1;143(1):46-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.001>.
451. Prensner JR, Iyer MK, Sahu A, Asangani IA, Cao Q, Patel L, et al. The long noncoding RNA SChLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1392-8. <https://doi.org/10.1038/ng.2771>.

452. Yao Y, Li J, Wang L. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is an indicator of poor prognosis and a therapeutic target in human cancers. *Int J Mol Sci*. 2014 Oct 20;15(10):18985-99. <https://doi.org/10.3390/ijms151018985>.
453. Zhang J, Zhang P, Wang L, Piao HL, Ma L. Long non-coding RNA HOTAIR in carcinogenesis and metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014 Jan;46(1):1-5. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt117>.
454. Song Y, Wang R, Li LW, Liu X, Wang YF, Wang QX, et al. Long non-coding RNA HOTAIR mediates the switching of histone H3 lysine 27 acetylation to methylation to promote epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2019 Jan;54(1):77-86. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4625>.
455. Richards EJ, Zhang G, Li ZP, Permuth-Wey J, Challa S, Li Y, et al. Long non-coding RNAs (LncRNA) regulated by transforming growth factor (TGF) β : LncRNA-hit-mediated TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition in mammary epithelia. *J Biol Chem*. 2015 Mar 13;290(11):6857-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610915>.
456. Dhamija S, Diederichs S. From junk to master regulators of invasion: lncRNA functions in migration, EMT and metastasis. *Int J Cancer*. 2016 Jul 15;139(2):269-80. <https://doi.org/10.1002/ijc.30039>.
457. Sciacovelli M, Frezza C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J*. 2017 Oct;284(19):3132-3144. <https://doi.org/10.1111/febs.14090>.
458. Werb Z, Lu P. The Role of Stroma in Tumor Development. *Cancer J*. 2015 Jul-Aug;21(4):250-3. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000127>.
459. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309-22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>.
460. Yuan Y, Jiang YC, Sun CK, Chen QM. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). *Oncol Rep*. 2016 May;35(5):2499-515. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4660>.

461. Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C, Marini FC. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 2016 Aug 11;18(1):84. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2>.
462. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer.* 2017 Feb 1;16(1):31. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0597-8>.
463. Raffaghello L, Dazzi F. Classification and biology of tumour associated stromal cells. *Immunol Lett.* 2015 Dec;168(2):175-82. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.016>.
464. Xiong Y, McDonald LT, Russell DL, Kelly RR, Wilson KR, Mehrotra M, et al. Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment. *World J Stem Cells.* 2015 Mar 26;7(2):253-65. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.253>.
465. Takahashi H, Sakakura K, Kudo T, Toyoda M, Kaira K, Oyama T, et al. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget.* 2017 Jan 31;8(5):8633-8647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14374>.
466. Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl).* 2013 Apr;91(4):411-29. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1021-5>.
467. Mezawa Y, Orimo A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):675-89. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2471-1>.
468. Sazeides C, Le A. Metabolic Relationship between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1063:149-165. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_11.
469. Patel AK, Vipparthi K, Thatikonda V, Arun I, Bhattacharjee S, Sharan R, et al. A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma. *Oncogenesis.* 2018 Oct 5;7(10):78. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0087-x>.

470. Ni WD, Yang ZT, Cui CA, Cui Y, Fang LY, Xuan YH. Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 May 6;486(3):607-612. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.021>.
471. Drev D, Bileck A, Erdem ZN, Mohr T, Timelthaler G, Beer A, et al. Proteomic profiling identifies markers for inflammation-related tumor-fibroblast interaction. *Clin Proteomics*. 2017 Oct 6;14:33. <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9168-7>.
472. Shen H, Yu X, Yang F, Zhang Z, Shen J, Sun J, et al. Reprogramming of Normal Fibroblasts into Cancer-Associated Fibroblasts by miRNAs-Mediated CCL2/VEGFA Signaling. *PLoS Genet*. 2016 Aug 19;12(8):e1006244. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006244>.
473. Chen L, Zeng X, Kleibeuker E, Buffa F, Barberis A, Leek RD, et al. Paracrine effect of GTP cyclohydrolase and angiopoietin-1 interaction in stromal fibroblasts on tumor Tie2 activation and breast cancer growth. *Oncotarget*. 2016 Feb 23;7(8):9353-67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6981>.
474. Knuchel S, Anderle P, Werfelli P, Diamantis E, Rüegg C. Fibroblast surface-associated FGF-2 promotes contact-dependent colorectal cancer cell migration and invasion through FGFR-SRC signaling and integrin $\alpha\beta 5$ -mediated adhesion. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14300-17.
475. Augsten M, Sjöberg E, Frings O, Vorrink SU, Frijhoff J, Olsson E, et al. Cancer-associated fibroblasts expressing CXCL14 rely upon NOS1-derived nitric oxide signaling for their tumor-supporting properties. *Cancer Res*. 2014 Jun 1;74(11):2999-3010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2740>.
476. Kuzet SE, Gaggioli C. Fibroblast activation in cancer: when seed fertilizessoil. *Cell Tissue Res*. 2016 Sep;365(3):607-19. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2467-x>.
477. Gok Yavuz B, Gunaydin G, Gedik ME, Kosemehmetoglu K, Karakoc D, Ozgur F, et al. Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1(+) TAMs. *Sci Rep*. 2019 Feb 28;9(1):3172. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39553-z>.

478. Na YR, Je S, Seok SH. Metabolic features of macrophages in inflammatory diseases and cancer. *Cancer Lett.* 2018 Jan 28;413:46-58. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.044>.
479. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol.* 2018 Feb;33(2):133-145. <https://doi.org/10.14670/HH-11-916>.
480. Nonnenmacher Y, Hiller K. Biochemistry of proinflammatory macrophage activation. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Jun;75(12):2093-2109. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2784-1>.
481. Netea-Maier RT, Smit JWA, Netea MG. Metabolic changes in tumor cells and tumor-associated macrophages: A mutual relationship. *Cancer Lett.* 2018 Jan 28;413:102-109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.037>.
482. Dutsch-Wicherek M, Kazmierczak W. Creation of a suppressive microenvironment by macrophages and cancer-associated fibroblasts. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2013 Jun 1;18:1003-16.
483. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018 Apr 17;48(4):812-830.e14. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.023>.
484. Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, et al. Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016 Aug 15;22(16):4057-66. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2879>.
485. Kalinski P, Talmadge JE. Tumor Immuno-Environment in Cancer Progression and Therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1036:1-18. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_1.
486. Cichon MA, Radisky DC. Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor- β signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer. *Cell Adh Migr.* 2014;8(6):588-94. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.972788>.

487. Moore-Smith LD, Isayeva T, Lee JH, Frost A, Ponnazhagan S. Silencing of TGF- β 1 in tumor cells impacts MMP-9 in tumor microenvironment. *Sci Rep.* 2017 Aug 17;7(1):8678. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09062-y>.
488. Fiore APZP, Ribeiro PF, Bruni-Cardoso A. Sleeping Beauty and the Microenvironment Enchantment: Microenvironmental Regulation of the Proliferation-Quiescence Decision in Normal Tissues and in Cancer Development. *Front Cell Dev Biol.* 2018 Jun 7;6:59. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00059>.
489. Vannucci L. Stroma as an Active Player in the Development of the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.* 2015 Dec;8(3):159-66. <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0150-x>
490. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Jan 1;3(1):a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
491. Chang TT, Thakar D, Weaver VM. Force-dependent breaching of the basement membrane. *Matrix Biol.* 2017 Jan;57-58:178-189. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.12.005>.
492. Fidler AL, Darris CE, Chetyrkin SV, Pedchenko VK, Boudko SP, Brown KL, et al. Collagen IV and basement membrane at the evolutionary dawn of metazoan tissues. *Elife.* 2017 Apr 18;6. pii: e24176. <https://doi.org/10.7554/eLife.24176>.
493. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Mar 6;38(1):115. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1110-6>.
494. Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology.* 2002 Mar;12(3):37R-42R.
495. Sukowati CHC, Anfuso B, Fiore E, Ie SI, Raseni A, Vascotto F, et al. Hyaluronic acid inhibition by 4-methylumbelliferone reduces the expression of cancer stem cells markers during hepatocarcinogenesis. *Sci Rep.* 2019 Mar 11;9(1):4026. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40436-6>.
496. Price ZK, Lokman NA, Ricciardelli C. Differing Roles of Hyaluronan Molecular Weight on Cancer Cell Behavior and Chemotherapy Resistance. *Cancers (Basel).* 2018 Dec 3;10(12). pii: E482. <https://doi.org/10.3390/cancers10120482>.

497. Chanmee T, Ontong P, Kimata K, Itano N. Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells. *Front Oncol.* 2015 Aug 10;5:180. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00180>.
498. McAtee CO, Barycki JJ, Simpson MA. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy. *Adv Cancer Res.* 2014;123:1-34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00001-0>.
499. Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, et al. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer.* 2011 Mar 15;128(6):1303-15. <https://doi.org/10.1002/ijc.25460>.
500. Schott S, Yang R, Stöcker S, Canzian F, Giese N, Bugert P, et al. HYAL2 methylation in peripheral blood as a potential marker for the detection of pancreatic cancer: a case control study. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(40):67614-67625. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18757>.
501. Criscitiello C, Esposito A, Curigliano G. Tumor-stroma crosstalk: targeting stroma in breast cancer. *Curr Opin Oncol.* 2014 Nov;26(6):551-5. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000122>.
502. Mayr LM, Bojanic D. Novel trends in high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Oct;9(5):580-8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.08.004>.
503. Wang Y, Cheng T, Bryant SH. PubChem BioAssay: A Decade's Development toward Open High-Throughput Screening Data Sharing. *SLAS Discov.* 2017 Jul;22(6):655-666. <https://doi.org/10.1177/2472555216685069>.
504. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia.* 2004 Jan-Feb;6(1):1-6.
505. Li DY, Chen WJ, Luo L, Wang YK, Shang J, Zhang Y, et al. Prospective lncRNA-miRNA-mRNA regulatory network of long non-coding RNA LINC00968 in non-small cell lung cancer A549 cells: A miRNA microarray and bioinformatics investigation. *Int J Mol Med.* 2017 Dec;40(6):1895-1906. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3187>.

506. Gu W, Sun Y, Zheng X, Ma J, Hu XY, Gao T, et al. Identification of Gastric Cancer-Related Circular RNA through Microarray Analysis and Bioinformatics Analysis. *Biomed Res Int.* 2018 Mar 18;2018:2381680. <https://doi.org/10.1155/2018/2381680>.
507. Müller S, Raulefs S, Bruns P, Afonso-Grunz F, Plötner A, Thermann R, et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2015 Apr 25;14:94. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0358-5>.
508. Shull AY, Noonepalle SK, Lee EJ, Choi JH, Shi H. Sequencing the cancer methylome. *Methods Mol Biol.* 2015;1238:627-51. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_33.
509. Del Vecchio F, Mastroiaco V, Di Marco A, Compagnoni C, Capece D, Zazzeroni F, et al. Next-generation sequencing: recent applications to the analysis of colorectal cancer. *J Transl Med.* 2017 Dec 8;15(1):246. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1353-y>.
510. Vogtmann E, Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer.* 2016 Feb 2;114(3):237-42. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.465>.
511. Mullish BH, Osborne LS, Marchesi JR, McDonald JA. The implementation of omics technologies in cancer microbiome research. *Ecancermedicalscience.* 2018 Sep 5;12:864. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2018.864>.
512. Sinclair I, Stearns R, Pringle S, Wingfield J, Datwani S, Hall E, et al. Novel Acoustic Loading of a Mass Spectrometer: Toward Next-Generation High-Throughput MS Screening. *J Lab Autom.* 2016 Feb;21(1):19-26. <https://doi.org/10.1177/2211068215619124>
513. Le Gallo M, Lozy F, Bell DW. Next-Generation Sequencing. *Adv Exp Med Biol.* 2017;943:119-148.
514. Chang YS, Huang HD, Yeh KT, Chang JG. Identification of novel mutations in endometrial cancer patients by whole-exome sequencing. *Int J Oncol.* 2017 May;50(5):1778-1784. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3919>.

515. Besaratinia A, Li H, Yoon JI, Zheng A, Gao H, Tommasi S. A high-throughput next-generation sequencing-based method for detecting the mutational fingerprint of carcinogens. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug;40(15):e116. <https://doi.org/10.1093/nar/gks610>.
516. Maslov AY, Quispe-Tintaya W, Gorbacheva T, White RR, Vijg J. High-throughput sequencing in mutation detection: A new generation of genotoxicity tests? *Mutat Res.* 2015 Jun;776:136-43. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.03.014>.
517. Wakai T, Prasoon P, Hirose Y, Shimada Y, Ichikawa H, Nagahashi M. Next-generation sequencing-based clinical sequencing: toward precision medicine in solid tumors. *Int J Clin Oncol.* 2019 Feb;24(2):115-122. <https://doi.org/10.1007/s10147-018-1375-3>.
518. Takeuchi S, Okuda S. Knowledge base toward understanding actionable alterations and realizing precision oncology. *Int J Clin Oncol.* 2019 Feb;24(2):123-130. <https://doi.org/10.1007/s10147-018-1378-0>.
519. Luthra R, Patel KP, Routbort MJ, Broaddus RR, Yau J, Simien C, et al. A Targeted High-Throughput Next-Generation Sequencing Panel for Clinical Screening of Mutations, Gene Amplifications, and Fusions in Solid Tumors. *J Mol Diagn.* 2017 Mar;19(2):255-264. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.09.011>.
520. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Kameyama H, Takabe K, Okuda S, et al. Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Sci.* 2019 Jan;110(1):6-15. <https://doi.org/10.1111/cas.13837>.
521. Morash M, Mitchell H, Beltran H, Elemento O, Pathak J. The Role of Next-Generation Sequencing in Precision Medicine: A Review of Outcomes in Oncology. *J Pers Med.* 2018 Sep 17;8(3). pii: E30. <https://doi.org/10.3390/jpm8030030>.
522. Siu LL, Conley BA, Boerner S, LoRusso PM. Next-Generation Sequencing to Guide Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 2015 Oct 15;21(20):4536-44. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3215>.
523. Groisberg R, Hong DS, Roszik J, Janku F, Tsimberidou AM, Javle M, et al. Clinical Next-Generation Sequencing for Precision Oncology in Rare Cancers. *Mol*

Cancer Ther. 2018 Jul;17(7):1595-1601. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1107>.

524. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Viale G, Trapani D, et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Jan;133:171-182. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.11.008>.

525. Sengupta S, Sun SQ, Huang KL, Oh C, Bailey MH, Varghese R, et al. Integrative omics analyses broaden treatment targets in human cancer. *Genome Med*. 2018 Jul 27;10(1):60. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0564-z>.

526. Yu KH, Snyder M. Omics Profiling in Precision Oncology. *Mol Cell Proteomics*. 2016 Aug;15(8):2525-36. <https://doi.org/10.1074/mcp.O116.059253>.

527. Tebani A, Afonso C, Marret S, Bekri S. Omics-Based Strategies in Precision Medicine: Toward a Paradigm Shift in Inborn Errors of Metabolism Investigations. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 14;17(9). pii: E1555. <https://doi.org/10.3390/ijms17091555>.

528. Ding MQ, Chen L, Cooper GF, Young JD, Lu X. Precision Oncology beyond Targeted Therapy: Combining Omics Data with Machine Learning Matches the Majority of Cancer Cells to Effective Therapeutics. *Mol Cancer Res*. 2018 Feb;16(2):269-278. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0378>.

529. Piñeiro-Yáñez E, Reboiro-Jato M, Gómez-López G, Perales-Patón J, Troulé K, Rodríguez JM, et al. PanDrugs: a novel method to prioritize anticancer drug treatments according to individual genomic data. *Genome Med*. 2018 May 31;10(1):41. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0546-1>.

530. Verma R, Sharma PC. Next generation sequencing-based emerging trends in molecular biology of gastric cancer. *Am J Cancer Res*. 2018 Feb 1;8(2):207-225.

531. Matsuoka T, Yashiro M. Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World J Gastroenterol*. 2018 Jul 14;24(26):2818-2832. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i26.2818>.

532. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015 Jun;4(3):256-269.

533. Ray P, Le Manach Y, Riou B, Houle TT. Statistical evaluation of a biomarker. *Anesthesiology*. 2010 Apr;112(4):1023-40. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181d47604>.
534. Duffy MJ, Sturgeon CM, Sölétormos G, Barak V, Molina R, Hayes DF, et al. Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. *Clin Chem*. 2015 Jun;61(6):809-20. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239863>.
535. Rigatto C, Barrett BJ. Randomized controlled trials 4: Biomarkers and surrogate outcomes. *Methods Mol Biol*. 2015;1281:207-24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2428-8_12.
536. Martinez-Ledesma E, Verhaak RG, Treviño V. Identification of a multi-cancer gene expression biomarker for cancer clinical outcomes using a network-based algorithm. *Sci Rep*. 2015 Jul 23;5:11966. <https://doi.org/10.1038/srep11966>.
537. Rubicz R, Zhao S, Wright JL, Coleman I, Grasso C, Geybels MS, et al. Gene expression panel predicts metastatic-lethal prostate cancer outcomes in men diagnosed with clinically localized prostate cancer. *Mol Oncol*. 2017 Feb;11(2):140-150. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12014>.
538. Beam CA. Statistical considerations when analyzing biomarker data. *Clin Immunol*. 2015 Nov;161(1):31-6. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.05.019>.
539. Chen DT, Huang PY, Lin HY, Haura EB, Antonia SJ, Cress WD, et al. Strategies for power calculations in predictive biomarker studies in survival data. *Oncotarget*. 2016 Dec 6;7(49):80373-80381. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12124>.
540. Meerpohl JJ, Blümle A, Antes G, Elm Ev. [Reporting guidelines are also useful for readers of medical research publications: CONSORT, STARD, STROBE and others]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2009 Oct;134(41):2078-83. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237560>.
541. Sauerbrei W, Taube SE, McShane LM, Cavenagh MM, Altman DG. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): An Abridged

Explanation and Elaboration. *J Natl Cancer Inst.* 2018 Aug 1;110(8):803-811. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy088>.

542. Jiang Z, Song Y, Shou Q, Xia J, Wang W. A Bayesian prediction model between a biomarker and the clinical endpoint for dichotomous variables. *Trials.* 2014 Dec 20;15:500. <https://doi.org/10.1186/1745-6215-15-500>.

543. Robin X. PanelomiX for the Combination of Biomarkers. *Methods Mol Biol.* 2019;1959:261-273. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9164-8_17.

544. Mazzara S, Rossi RL, Grifantini R, Donizetti S, Abrignani S, Bombaci M. CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. *Sci Rep.* 2017 Mar 30;7:45477. <https://doi.org/10.1038/srep45477>.

545. Gola D, Mahachie John JM, van Steen K, König IR. A roadmap to multifactor dimensionality reduction methods. *Brief Bioinform.* 2016 Mar;17(2):293-308. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv038>.

546. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statist Society.* 1995;57:289–300.

547. Mahachie John JM, Van Lishout F, Van Steen K. Model-Based Multifactor Dimensionality Reduction to detect epistasis for quantitative traits in the presence of error-free and noisy data. *Eur J Hum Genet.* 2011 Jun;19(6):696-703. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.17>.

548. Motsinger AA, Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Hum Genomics.* 2006 Mar;2(5):318-28.

549. Zabarovsky ER, Kashuba VI, Gizatullin RZ, Winberg G, Zabarovska VI, Erlandsson R, et al. NotI jumping and linking clones as a tool for genome mapping and analysis of chromosome rearrangements in different tumors. *Cancer Detect Prev.* 1996;20(1):1-10.

550. Kashuba VI, Gizatullin RZ, Protopopov AI, Li J, Vorobieva NV, Fedorova L, et al. Analysis of NotI linking clones isolated from human chromosome 3 specific libraries. *Gene.* 1999 Nov 1;239(2):259-71.

551. Гордіюк ВВ, Геращенко ГВ, Скрипкіна ІЯ, Симончук ОВ, Павлова ТВ, Угрин ДД, та інші. Виявлення епігенетичних і генетичних порушень та зміни експресії генів 3-ої хромосоми людини при раку яєчника. *Biopolym Cell*. 2008; 24(4):323-332. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007B0>
552. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk VV, Gerashchenko AV, et al. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Oct 18;13(10):13352-77. <https://doi.org/10.3390/ijms131013352>.
553. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Skrypkina IY, Kvasha SM, Kolesnik OO, Ugryn DD, et al. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukr Biokhim Zh (1999)*. 2009 Jul-Aug;81(4):81-7.
554. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, et al. Identification of Novel Epigenetic Markers of Prostate Cancer by NotI-Microarray Analysis. *Dis Markers*. 2015;2015:241301. <https://doi.org/10.1155/2015/241301>.
555. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic alterations of human chromosome 3, investigated by NotI-microarrays in seven types of epithelial cancers. *Biopolym. Cell*. 2018; 34(4):303-312. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000983>
556. Gordiyuk VV, Kondratov AG, Gerashchenko GV, Kashuba VI. Novel epigenetic markers of early epithelial tumor growth and prognosis. *Biopolym Cell*. 2013; 29(3):215-220. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00081B>
557. Dunwell TL, Hesson LB, Pavlova T, Zabarovska V, Kashuba V, Catchpoole D, et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. 2009 Apr 1;4(3):185-93.
558. Zabarovsky ER, Allikmets R, Kholodnyuk I, Zabarovska VI, Paulsson N, Bannikov VM, et al. Construction of representative NotI linking libraries specific for the total human genome and for human chromosome 3. *Genomics*. 1994; 20(2):312-6.

559. Uzawa N, Yoshida MA, Hosoe S, Oshimura M, Amagasa T, Ikeuchi T. Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor genes on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 107(2):125-31.
560. Kandimalla R, van Tilborg AA, Kompier LC, Stumpel DJ, Stam RW, Bangma CH, et al. Genome-wide analysis of CpG island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers. *Eur Urol.* 2012 Jun;61(6):1245-56. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.01.011>.
561. Davis AJ, Yan Z, Martinez B, Mumby MC. Protein phosphatase 2A is targeted to cell division control protein 6 by a calcium-binding regulatory subunit. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):16104-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710313200>.
562. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015 May-Jun;4(3):215-66. <https://doi.org/10.1002/wdev.176>.
563. Li H, Du Y, Zhang D, Wang LN, Yang C, Liu B, et al. Identification of novel DNA methylation markers in colorectal cancer using MIRA-based microarrays. *Oncol Rep.* 2012 Jul;28(1):99-104. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1779>.
564. Bhushan A, Singh A, Kapur S, Borthakar BB, Sharma J, Rai AK, et al. Identification and Validation of Fibroblast Growth Factor 12 Gene as a Novel Potential Biomarker in Esophageal Cancer Using Cancer Genomic Datasets. *OMICS.* 2017 Oct;21(10):616-631. <https://doi.org/10.1089/omi.2017.0116>.
565. Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA. Epigenetic Silencing of ALDH1L1, a Metabolic Regulator of Cellular Proliferation, in Cancers. *Genes Cancer.* 2011 Feb;2(2):130-9. <https://doi.org/10.1177/1947601911405841>.
566. Fitzgerald TL, Rangan S, Dobbs L, Starr S, Sigounas G. The impact of Aldehyde dehydrogenase 1 expression on prognosis for metastatic colon cancer. *J Surg Res.* 2014 Nov;192(1):82-9. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.05.054>.
567. Tam KJ, Dalal K, Hsing M, Cheng CW, Khosravi S, Yenki P, et al. Androgen receptor transcriptionally regulates semaphorin 3C in a GATA2-dependent manner. *Oncotarget.* 2017 Feb 7;8(6):9617-9633. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14168>.

568. Rodriguez-Bravo V, Carceles-Cordon M, Hoshida Y, Cordon-Cardo C, Galsky MD, Domingo-Domenech J. The role of GATA2 in lethal prostate cancer aggressiveness. *Nat Rev Urol.* 2017 Jan;14(1):38-48. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.225>.
569. Katsumura KR, Ong IM, DeVilbiss AW, Sanalkumar R, Bresnick EH. GATA Factor-Dependent Positive-Feedback Circuit in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cell Rep.* 2016 Aug 30;16(9):2428-41. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.058>.
570. Kampen KR, Scherpen FJ, Garcia-Manero G, Yang H, Kaspers GJ, Cloos J, et al. EphB1 Suppression in Acute Myelogenous Leukemia: Regulating the DNA Damage Control System. *Mol Cancer Res.* 2015 Jun;13(6):982-92. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0660-T>.
571. Brantley-Sieders DM. Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Feb;23(1):102-8. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.10.014>.
572. Thomas ML, Marcato P. Epigenetic Modifications as Biomarkers of Tumor Development, Therapy Response, and Recurrence across the Cancer Care Continuum. *Cancers (Basel).* 2018 Apr 1;10(4). pii: E101. <https://doi.org/10.3390/cancers10040101>.
573. Ellinger J, Müller SC, Dietrich D. Epigenetic biomarkers in the blood of patients with urological malignancies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015 Apr;15(4):505-16. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1019477>.
574. Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Nov;1790(11):1555-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.006>.
575. Rolny C, Capparuccia L, Casazza A, Mazzone M, Vallario A, Cignetti A, et al. The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med.* 2008 May 12;205(5):1155-71. <https://doi.org/10.1084/jem.20072509>.

576. Hatfield DL, Yoo MH, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Nov;1790(11):1541-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.001>.
577. Gerashchenko GV, Bogatyrova OO, Rudenko EE, Kondratov AG, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, et al. Genetic and epigenetic changes of NKIRAS1 gene in human renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2010 Jul;32(2):71-5.
578. Руденко ЄЄ, Геращенко ГВ, Гордіюк ВВ, Кондратов АГ, Кашуба ВІ. PPM1M як потенційний ген супресор росту пухлин у світлоклітинних карциномах нирки людини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2011; 11:522-26.
579. Kondratov AG, Stoliar LA, Kvasha SM, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Gerashchenko AV, et al. Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas. *Mol Med Rep*. 2012 Feb;5(2):509-12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.681>.
580. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Bogatyrova OO, Voizianov SO, Zgonnyk YM, et al. Genetic and epigenetic changes of GPX1 and GPX3 in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell*. 2013; 29(5):395-401. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00082F>
581. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Voizianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. PPM1M and PRICKLE2 are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell*. 2014; 30(3):229-233. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089A>
582. Rudenko EE, Lapska YV, Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Vikarchuk MV, Kashuba VI. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of PPM1M and PRICKLE2 genes in human clear cell renal cell carcinomas. *Biopolym. Cell*. 2015; 31(1):29-33. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008C9>
583. Rudenko E, Kondratov O, Gerashchenko G, Lapska Y, Kravchenko S, Koliada O, et al. Aberrant expression of selenium-containing glutathione peroxidases in clear cell renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2015 Jun;37(2):105-10.

584. Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Snezhkina AV, Gerashchenko AV, Rudenko EE, et al. Comparative analysis of methylation/deletion patterns of chromosome 3 in different cancer types using NotI-microarrays. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug - 4 Sept 2014. FEBS Journal. 2014;281(Suppl. 1):297-98. <https://doi.org/10.1111/febs.12919>
585. Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospects for translational applications. *Future Oncol.* 2005 Feb;1(1):79-92.
586. Castro-Rivera E, Ran S, Brekken RA, Minna JD. Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8295-303. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6601>.
587. Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, Gray MJ, et al. Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 15;15(22):6763-70. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1810>.
588. Staton CA, Shaw LA, Valluru M, Hoh L, Koay I, Cross SS, et al. Expression of class 3 semaphorins and their receptors in human breast neoplasia. *Histopathology.* 2011 Aug;59(2):274-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03922.x>.
589. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, et al. Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One.* 2015 May 11;10(5):e0123369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123369>.
590. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Oct 1;15(7):1957-97. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>.
591. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May;2(5):401-4. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>.

592. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>.
593. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol*. 2016 Oct 7;17(1):208.
594. Goldsworthy SM, Goldsworthy TL, Sprankle CS, Butterworth BE. Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of cell proliferation. *Cell Prolif*. 1993 Nov;26(6):511-8.
595. Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol Rep*. 2005 Dec;14(6):1583-8.
596. Henmi T, Amano K, Nagaura Y, Matsumoto K, Echigo S, Tamura S, et al. A mechanism for the suppression of interleukin-1-induced nuclear factor kappaB activation by protein phosphatase 2Ceta-2. *Biochem J*. 2009 Sep 14;423(1):71-8. <https://doi.org/10.1042/BJ20090208>.
597. Tang H, Wu Y, Liu M, Qin Y, Wang H, Wang L, et al. SEMA3B improves the survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma by upregulating p53 and p21. *Oncol Rep*. 2016 Aug;36(2):900-8. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4901>.
598. Cucchiara V, Cooperberg MR, Dall'Era M, Lin DW, Montorsi F, Schalken JA, et al. Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *Eur Urol*. 2018 Apr;73(4):572-582. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.10.036>.
599. Miyahira AK, Den RB, Carlo MI, de Leeuw R, Hope TA, Karzai F, et al. Tumor cell heterogeneity and resistance; report from the 2018 Coffey-Holden Prostate Cancer Academy Meeting. *Prostate*. 2019 Feb;79(3):244-258. <https://doi.org/10.1002/pros.23729>.
600. Salami SS, Hovelson DH, Kaplan JB, Mathieu R, Udager AM, Curci NE, et al. Transcriptomic heterogeneity in multifocal prostate cancer. *JCI Insight*. 2018 Nov 2;3(21). pii: 123468. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123468>.

601. Nguyen T, Boldt RG, Rodrigues G. Prognostic Factors for Prostate Cancer Endpoints Following Biochemical Failure: A Review of the Literature. *Cureus*. 2015 Jan 5;7(1):e238. <https://doi.org/10.7759/cureus.238>.
602. Gerlinger M, Catto JW, Orntoft TF, Real FX, Zwarthoff EC, Swanton C. Intratumour heterogeneity in urologic cancers: from molecular evidence to clinical implications. *Eur Urol*. 2015 Apr;67(4):729-37. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.04.014>.
603. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther*. 2013 Dec;140(3):223-38. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>.
604. Ahmadi H, Daneshmand S. Androgen deprivation therapy for prostate cancer: long-term safety and patient outcomes. *Patient Relat Outcome Meas*. 2014 Jul 5;5:63-70. <https://doi.org/10.2147/PROM.S52788>.
605. Katsogiannou M, Ziouziou H, Karaki S, Andrieu C, Henry de Villeneuve M, Rocchi P. The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. *Cancer Treat Rev*. 2015 Jul;41(7):588-97. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.05.003>.
606. Grigore AD, Ben-Jacob E, Farach-Carson MC. Prostate cancer and neuroendocrine differentiation: more neuronal, less endocrine? *Front Oncol*. 2015 Mar 3;5:37. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00037>.
607. Gnanapragasam VJ. Molecular markers to guide primary radical treatment selection in localized prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014 Sep;14(7):871-81. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.936851>.
608. Delporte G, Henon F, Ploussard G, Briganti A, Rizk J, Rozet F, et al. Radical prostatectomy for locally advanced and high-risk prostate cancer: A systematic review of the literature. *Prog Urol*. 2018 Dec;28(16):875-889. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2018.08.007>.
609. Van den Broeck T, van den Bergh RCN, Arfi N, Gross T, Moris L, Briers E, Cumberbatch M, et al. Prognostic Value of Biochemical Recurrence Following Treatment with Curative Intent for Prostate Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol*.

- 2018 Oct 17. pii: S0302-2838(18)30752-8.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.10.011>.
610. Kretschmer A, Tilki D. Biomarkers in prostate cancer - Current clinical utility and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Dec;120:180-193.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.007>.
611. Esfahani M, Ataei N, Panjehpour M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(7):2601-11.
612. Eiro N, Fernandez-Gomez J, Sacristán R, Fernandez-Garcia B, Lobo B, Gonzalez-Suarez J, et al. Stromal factors involved in human prostate cancer development, progression and castration resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Feb;143(2):351-359. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2284-3>.
613. Bianchi-Frias D, Damodarasamy M, Hernandez SA, Gil da Costa RM, Vakar-Lopez F, Coleman IM, et al. The Aged Microenvironment Influences the Tumorigenic Potential of Malignant Prostate Epithelial Cells. *Mol Cancer Res*. 2019 Jan;17(1):321-331. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0522>.
614. Cunningham D, You Z. *In vitro* and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015;2(1). pii: e17.
615. Berthon P, Cussenot O, Hopwood L, Leduc A, Maitland N. Functional expression of sv40 in normal human prostatic epithelial and fibroblastic cells - differentiation pattern of nontumorigenic cell-lines. *Int J Oncol*. 1995 Feb;6(2):333-43.
616. Bainbridge MN, Warren RL, Hirst M, Romanuik T, Zeng T, Go A, et al. Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC Genomics*. 2006 Sep 29;7:246.
617. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett*. 2006 Apr 17;580(9):2294-300.
618. Dai J, Hensel J, Wang N, Kruihof-de Julio M, Shiozawa Y. Mouse models for studying prostate cancer bone metastasis. *Bonekey Rep*. 2016 Feb 17;5:777.
<https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.4>.

619. Розенберг ЄЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів у нормальній клітинній лінії та у клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014 Бер-Квіт;86(2):119-28.
620. Ni M, Chen Y, Fei T, Li D, Lim E, Liu XS, et al. Amplitude modulation of androgen signaling by c-MYC. *Genes Dev.* 2013 Apr 1; 27(7):734-48. <https://doi.org/10.1101/gad.209569.112>.
621. Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on FAT1, FAT2, FAT3 and FAT4. *Int J Mol Med.* 2006 Sep;18(3):523-8.
622. Yokoyama NN, Shujuan Shao S, Hoang BH, Mercola D, Zi X. Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol.* 2014; 2(1): 27–44.
623. Takezako N, Hayakawa M, Hayakawa H, Aoki S, Yanagisawa K, Endo H, et al. ST2 suppresses IL-6 production via the inhibition of IkappaB degradation induced by the LPS signal in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 10;341(2):425-32.
624. Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8 regulated Chemokine Receptor CXCR7 Stimulates EGFR Signaling to Promote Prostate Cancer Growth. *Cancer Res.* 2011 May 1; 71(9): 3268–3277.
625. Chen MC, Baskaran R, Lee NH, Hsu HH, Ho TJ, Tu CC, et al. CXCL2/CXCR2 axis induces cancer stem cell characteristics in CPT-11-resistant LoVo colon cancer cells via Gai-2 and Gαq/11. *J Cell Physiol.* 2019 Jul;234(7):11822-11834. <https://doi.org/10.1002/jcp.27891>.
626. Liu M, Liu J, Yang B, Gao X, Gao LL, Kong QY, et al. Inversed Expression Patterns of S100A4 and E-Cadherin in Cervical Cancers: Implication in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Anat Rec (Hoboken).* 2017 Dec;300(12):2184-2191. <https://doi.org/10.1002/ar.23688>.
627. Jędroszka D, Orzechowska M, Hamouz R, Bednarek AK. Markers of epithelial-to-mesenchymal transition reflect tumor biology according to patient age and Gleason score in prostate cancer. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0188842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188842>.

628. Ilieva KM, Cheung A, Mele S, Chiaruttini G, Crescioli S, Griffin M. et al. Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 and Its Potential As an Antibody Immunotherapy Target across Different Tumor Types. *Front Immunol.* 2017; 8: 1911. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01911>.
629. Husa AM, Magić Z, Larsson M, Fornander T, Pérez-Tenorio G. EPH/ephrin profile and EPHB2 expression predicts patient survival in breast cancer. *Oncotarget.* 2016 Apr 19; 7(16): 21362–21380. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7246>
630. Ozerdem U. Targeting of pericytes diminishes neovascularization and lymphangiogenesis in prostate cancer. *Prostate.* 2006 Feb 15;66(3):294-304.
631. Blanc V, Nariculam J, Munson P, Freeman A, Klocker H, Masters J, et al. A role for class 3 semaphorins in prostate cancer. *Prostate.* 2011 May;71(6):649-58. <https://doi.org/10.1002/pros.21281>.
632. Strock CJ, Park JI, Nakakura EK, Bova GS, Isaacs JT, Ball DW, et al. Cyclin-dependent kinase 5 activity controls cell motility and metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2006 Aug 1;66(15):7509-15.
633. Gu ZD, Shen LY, Wang H, Chen XM, Li Y, Ning T, et al. HOXA13 promotes cancer cell growth and predicts poor survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2009 Jun 15;69(12):4969-73. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
634. Pang JB, Molania R, Chand A, Knower K, Takano EA, Byrne DJ, et al. LRH-1 expression patterns in breast cancer tissues are associated with tumour aggressiveness. *Oncotarget.* 2017 Jul 28;8(48):83626-83636. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18886>.
635. Hagelgans A, Menschikowski M, Fuessel S, Nacke B, Arneth BM, Wirth MP, et al. Deregulated expression of urokinase and its inhibitor type 1 in prostate cancer cells: role of epigenetic mechanisms. *Exp Mol Pathol.* 2013 Jun;94(3):458-65. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.03.006>.
636. Patrikidou A, Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Hatzidaki E, Valeri RM, Destouni C, et al. Inverse baseline expression pattern of the NEP/neuropeptides and NFκB/proteasome pathways in androgen-dependent and androgen-independent

prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2011 May 15;11(1):13. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-11-13>.

637. Marcuzzi E, Angioni R, Molon D, Cali B. Chemokines and Chemokine Receptors: Orchestrating Tumor Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan; 20(1): 96. <https://doi.org/10.3390/ijms20010096>

638. Murthy S, Wu M, Bai U, Hou Z, Menon M, Barrack ER, et al. Role of Androgen Receptor in Progression of LNCaP Prostate Cancer Cells from G1 to S Phase. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056692>

639. Розенберг ЄЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григор'єва ЄВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини. *Biopolym Cell.* 2013; 29(6):499-505. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000840>.

640. Rosenberg E, Gerashchenko G, Kashuba V. Search for potential biomarkers of prostate cancer. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів. Львів. 2014. 8-11 квітня., 2014; Збірник тез:230-231.

641. Lin Y, Fukuchi J, Hiiapakka RA, Kokontis JM, Xiang J. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage. *Cell Res.* 2007 Jun;17(6):531-6.

642. Huerta-Yepez S, Baritaki S, Baay-Guzman G, Hernandez-Luna MA, Hernandez-Cueto A, Vega MI, et al. Contribution of either YY1 or BclXL-induced inhibition by the NO-donor DETANONOate in the reversal of drug resistance, both *in vitro* and *in vivo*. YY1 and BclXL are overexpressed in prostate cancer. *Nitric Oxide.* 2013 Feb 28;29:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.12.001>.

643. Tang YQ, Jaganath I, Manikam R, Sekaran SD. Phyllanthus Suppresses Prostate Cancer Cell, PC-3, Proliferation and Induces Apoptosis through Multiple Signalling Pathways (MAPKs, PI3K/Akt, NFκB, and Hypoxia). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:609581. <https://doi.org/10.1155/2013/609581>.

644. Long Q, Johnson BA, Osunkoya AO, Lai YH, Zhou W, Abramovitz M, et al. Protein-coding and microRNA biomarkers of recurrence of prostate cancer following

- radical prostatectomy. *Am J Pathol.* 2011 Jul;179(1):46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.008>.
645. Zhu Q, Youn H, Tang J, Tawfik O, Dennis K, Terranova PF, et al. Phosphoinositide 3-OH kinase p85alpha and p110beta are essential for androgen receptor transactivation and tumor progression in prostate cancers. *Oncogene.* 2008 Jul 31;27(33):4569-79. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.91>.
646. Rostad K, Mannelqvist M, Halvorsen OJ, Oyan AM, Bø TH, Stordrange L, et al. ERG upregulation and related ETS transcription factors in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2007 Jan;30(1):19-32.
647. DU L, Wu W. A mimic of phosphorylated prolactin induces apoptosis by activating AP-1 and upregulating p21/waf1 in human prostate cancer PC3 cells. *Oncol Lett.* 2012 Nov;4(5):1064-1068.
648. Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, et al. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol.* 2010 May 1;79(9):1272-80. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.12.021>.
649. Chen J, Jiao L, Xu C, Yu Y, Zhang Z, Chang Z, et al. Neural protein gamma-synuclein interacting with androgen receptor promotes human prostate cancer progression. *BMC Cancer.* 2012 Dec 11;12:593. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-593>.
650. Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR. Integrins in prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2008 Sep;15(3):657-64. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0019>.
651. Juan-Rivera MC, Martínez-Ferrer M. Integrin Inhibitors in Prostate Cancer. *Cancers (Basel).* 2018 Feb 6;10(2). pii: E44. <https://doi.org/10.3390/cancers10020044>.
652. Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F, Landberg G, Heldin CH, et al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2009 Jul;175(1):334-41. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081030>.

653. Amatangelo MD, Goodyear S, Varma D, Stearns ME. c-Myc expression and MEK1-induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial-mesenchymal transition and invasion in prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2012 Oct;33(10):1965-75. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs227>.
654. Firlej V, Mathieu JR, Gilbert C, Lemonnier L, Nakhlé J, Gallou-Kabani C, et al. Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res*. 2011 Dec 15;71(24):7649-58. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0833>.
655. Darrington E, Zhong M, Vo BH, Khan SA. Vascular endothelial growth factor A, secreted in response to transforming growth factor- β 1 under hypoxic conditions, induces autocrine effects on migration of prostate cancer cells. *Asian J Androl*. 2012 Sep;14(5):745-51. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.197>.
656. Rosenberg E., Gerashchenko G, Kashuba V. Effect of D-Glucuronyl C5-Epimerase expression in prostate cancer cell lines. XI Український біохімічний конгрес 6-10 жовтня 2014 р., м.Київ, Україна, *Ukr Biochem J*. 2014 6:59.
657. Maeda A, Nakashiro K, Hara S, Sasaki T, Miwa Y, Tanji N, et al. Inactivation of AR activates HGF/c-Met system in human prostatic carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 8;347(4):1158-65.
658. Teoh SS, Whisstock JC, Bird PI. Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin. *J Biol Chem*. 2010 Apr 2;285(14):10862-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.073171>.
659. Eide T, Ramberg H, Glackin C, Tindall D, Tasken KA. TWIST1, a novel androgen-regulated gene, is a target for NKX3-1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2013 13(1):4.
660. Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr*. 2012 Jul-Aug;6(4):365-73. <https://doi.org/10.4161/cam.21326>.
661. Dvorakova M, Nenutil R, Bouchal P. Transgelins, cytoskeletal proteins implicated in different aspects of cancer development. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Apr;11(2):149-65. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.860358>.

662. Slattery ML, Mullany LE, Sakoda L, Samowitz WS, Wolff RK, Stevens JR, et al. The NF- κ B signalling pathway in colorectal cancer: associations between dysregulated gene and miRNA expression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018 Feb;144(2):269-283. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2548-6>.
663. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- β : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Aug 3;13(8):1741-1750. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1327107>.
664. Jo M, Takimoto S, Montel V, Gonias SL. The urokinase receptor promotes cancer metastasis independently of urokinase-type plasminogen activator in mice. *Am J Pathol*. 2009 Jul;175(1):190-200. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081053>.
665. Gilder AS, Natali L, Van Dyk DM, Zalfa C, Banki MA, Pizzo DP, et al. The Urokinase Receptor Induces a Mesenchymal Gene Expression Signature in Glioblastoma Cells and Promotes Tumor Cell Survival in Neurospheres. *Sci Rep*. 2018 Feb 14;8(1):2982. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21358-1>.
666. Gonias SL, Hu J. Urokinase receptor and resistance to targeted anticancer agents. *Front Pharmacol*. 2015 Jul 27;6:154. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00154>.
667. Shankar E, Song K, Corum SL, Bane KL, Wang H, Kao HY, et al. Signaling Network Controlling Androgenic Repression of c-Fos Protein in Prostate Adenocarcinoma Cells. *J Biol Chem*. 2016 Mar 11;291(11):5512-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694877>.
668. Bakiri L, Hamacher R, Graña O, Guío-Carrión A, Campos-Olivas R, Martinez L, et al. Liver carcinogenesis by FOS-dependent inflammation and cholesterol dysregulation. *J Exp Med*. 2017 May 1;214(5):1387-1409. <https://doi.org/10.1084/jem.20160935>.
669. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol*. 2011 Jan;59(1):61-71. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2010.10.039>.

670. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017 Apr;71(4):618-629. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.003>.
671. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, et al. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol.* 2017 Jul;39(2):131-137.
672. Розенберг ЄЕ, Кашуба ВІ, Геращенко ГВ, Литвиненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку передміхурової залози. XIII з'їзд онкологів та радіологів України 26-28 травня 2016, Київ, Україна. *Укр. Радіол. журнал.* 2016;Додаток 1:114-115.
673. Rozenberg E, Gerashchenko G, Hryshchenko N, Lytvinenko N, Vitruk Yu, Gryzodub O, et al. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Mini-symposium "New trends in cancer research and innovative tumor vaccines" May 11, 2017 Kyiv, Ukraine, *Exp Oncol.* 2017;39(2):157-160.
674. Wyatt AW, Mo F, Wang K, McConeghy B, Brahmabhatt S, Jong L, et al. Heterogeneity in the inter-tumor transcriptome of high risk prostate cancer. *Genome Biol.* 2014 Aug 26;15(8):426. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0426-y>.
675. Beltran H, Yelensky R, Frampton GM, Park K, Downing SR, MacDonald TY, et al. Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Eur Urol.* 2013 May;63(5):920-6. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.08.053>.
676. Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Chashchina LI, Gryzodub OP, Kashuba VI. A role of expression level of reference and investigated genes in prostate tumors for qPCR analysis. *Biopolym Cell.* 2018; 34(2):85-96. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000973>.
677. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* 2010 Jan;55(1):25-33. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>.

678. Pionzio AM, McCord BR. The effect of internal control sequence and length on the response to PCR inhibition in real-time PCR quantitation. *Forensic Sci Int Genet.* 2014 Mar;9:55-60. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.010>.
679. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012 Nov;113(5):1014-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
680. Souza AF, Brum IS, Neto BS, Berger M, Branchini G. Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2013 Apr;40(4):2955-62. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2366-5>.
681. Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, et al. Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate.* 2006 Oct 1;66(14):1521-34.
682. Carlisle AJ, Prabhu VV, Elkahloun A, Hudson J, Trent JM, Linehan WM, et al. Development of a prostate cDNA microarray and statistical gene expression analysis package. *Mol Carcinog.* 2000 May;28(1):12-22.
683. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel).* 2018 Feb 16;10(2). pii: E52. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>.
684. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1417-9. <https://doi.org/10.1172/JCI39675>.
684. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, et al. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol.* 2009 Aug;56(2):275-86. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.04.036>.
685. Cai C, Wang H, Xu Y, Chen S, Balk SP. Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2009 Aug 1;69(15):6027-32. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0395>.
686. Feng FY, Brenner JC, Hussain M, Chinnaiyan AM. Molecular pathways: targeting ETS gene fusions in cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Sep 1;20(17):4442-8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0275>.

687. Ratz L, Laible M, Kacprzyk LA, Wittig-Blaich SM, Tolstov Y, Duensing S, et al. TMPRSS2:ERG gene fusion variants induce TGF- β signaling and epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):25115-25130. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15931>.
688. Zhao S, Løvf M, Carm KT, Bakken AC, Hoff AM, Skotheim RI. Novel transcription-induced fusion RNAs in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Jul 25;8(30):49133-49143. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17099>.
689. Li H, Wang J, Ma X, Sklar J. Gene fusions and RNA trans-splicing in normal and neoplastic human cells. *Cell Cycle*. 2009 Jan 15;8(2):218-22.
690. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):644-8.
691. Rubin MA. ETS rearrangements in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2012 May;14(3):393-9. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.145>.
692. Bhanushali A, Rao P, Raman V, Kokate P, Ambekar A, Mandva S, et al. Status of TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer patients from India: correlation with clinico-pathological details and TMPRSS2 Met160Val polymorphism. *Prostate Int*. 2018 Dec;6(4):145-150. <https://doi.org/10.1016/j.pnil.2018.03.004>.
693. Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR, et al. Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):73-80. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5352>.
694. Dong J, Xiao L, Sheng L, Xu J, Sun ZQ. TMPRSS2:ETS fusions and clinicopathologic characteristics of prostate cancer patients from Eastern China. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(7):3099-103.
695. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, et al. Detection of prostate specific ETS fusion transcripts in cancer samples. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(4):256-267. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000958>

696. Lapointe J, Kim YH, Miller MA, Li C, Kaygusuz G, van de Rijn M, et al. A variant TMPRSS2 isoform and ERG fusion product in prostate cancer with implications for molecular diagnosis. *Mod Pathol*. 2007 Apr;20(4):467-73.
697. Luo JH, Liu S, Zuo ZH, Chen R, Tseng GC, Yu YP. Discovery and Classification of Fusion Transcripts in Prostate Cancer and Normal Prostate Tissue. *Am J Pathol*. 2015 Jul;185(7):1834-45. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.008>.
698. Spans L, Clinckemalie L, Helsen C, Vanderschueren D, Boonen S, Lerut E, et al. The genomic landscape of prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013 May 24;14(6):10822-51. <https://doi.org/10.3390/ijms140610822>.
699. Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene*. 2007 Apr 19;26(18):2667-73.
700. Meisel Sharon S, Pozniak Y, Geiger T, Werner H. TMPRSS2-ERG fusion protein regulates insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) gene expression in prostate cancer: involvement of transcription factor Sp1. *Oncotarget*. 2016 Aug 9;7(32):51375-51392. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9837>.
701. Navaei AH, Walter BA, Moreno V, Pack SD, Pinto P, Merino MJ. Correlation between ERG Fusion Protein and Androgen Receptor Expression by Immunohistochemistry in Prostate, Possible Role in Diagnosis and Therapy. *J Cancer*. 2017 Aug 5;8(13):2604-2613. <https://doi.org/10.7150/jca.16751>.
702. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010 Jul 13;18(1):11-22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.026>.
703. Song H, Zhang B, Watson MA, Humphrey PA, Lim H, Milbrandt J. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. *Oncogene*. 2009 Sep 17;28(37):3307-19. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.181>.
704. Pećina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*. 2003 Oct 14;3(1):17.

705. Martin TA, Mansel RE, Jiang WG. Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. *Int J Mol Med*. 2010 Nov;26(5):723-34.
706. Niknami Z, Eslamifar A, Emamirazavi A, Ebrahimi A, Shirkoohi R. The association of vimentin and fibronectin gene expression with epithelial-mesenchymal transition and tumor malignancy in colorectal carcinoma. *EXCLI J*. 2017 Jul 10;16:1009-1017. <https://doi.org/10.17179/excli2017-481>.
707. Zhong WD, Han ZD, He HC, Bi XC, Dai QS, Zhu G, et al. CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. *Oncology*. 2008;75(3-4):230-6. <https://doi.org/10.1159/000163852>.
708. Chappell WH, Abrams SL, Lertpiriyapong K, Fitzgerald TL, Martelli AM, Cocco L, et al. Novel roles of androgen receptor, epidermal growth factor receptor, TP53, regulatory RNAs, NF-kappa-B, chromosomal translocations, neutrophil associated gelatinase, and matrix metalloproteinase-9 in prostate cancer and prostate cancer stem cells. *Adv Biol Regul*. 2016 Jan;60:64-87. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.001>.
709. Zhu ML, Kyprianou N. Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J*. 2010 Mar;24(3):769-77. <https://doi.org/10.1096/fj.09-136994>.
710. Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med*. 2012 Mar 28;4(127):127rv3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003180>.
711. Fortier AM, Asselin E, Cadrin M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem*. 2013 Apr 19;288(16):11555-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428920>.
712. Ha SA, Lee YS, Kim HK, Yoo J, Kim S, Gong GH, Lee YK, et al. The prognostic potential of keratin 18 in breast cancer associated with tumor dedifferentiation, and the loss of estrogen and progesterone receptors. *Cancer Biomark*. 2011;10(5):219-31. <https://doi.org/10.3233/CBM-2012-0250>.

713. Tretiakova MS, Wei W, Boyer HD, Newcomb LF, Hawley S, Auman H, et al. Prognostic value of Ki67 in localized prostate carcinoma: a multi-institutional study of >1000 prostatectomies. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2016 Sep;19(3):264-70. <https://doi.org/10.1038/pcan.2016.12>.
714. O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Feb;9(2):738-42.
715. Jager R, Zwacka RM. The enigmatic roles of caspases in tumor development. *Cancer (Basel)*. 2010; 2(4):1952–1979.
716. Obexer P, Ausserlechner MJ. X-linked inhibitor of apoptosis protein – a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy. *Front Oncol.* 2014;4:197.
717. Lemos AE, Ferreira LB, Batoreu NM, de Freitas PP, Bonamino MH, Gimba ER. PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2016;37(8):11339–48.
718. Hajjari M, Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biol Med.* 2015; 12(1):1–9.
719. Prensner JR, Iyer MK, Sahu A, Asangani IA, Cao Q, Patel L, et al. The long noncoding RNA SChLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nat Genet.* 2013;45(11): 1392–8.
720. Gerashchenko GV, Mankovska OS, Dmitriev AA, Mevs LV, Rosenberg EE, Pikul MV, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours. *Biopolym. Cell.* 2017; 33(5):335-355. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00095E>
721. Zhou Y, Bolton EC, Jones JO. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *J Mol Endocrinol.* 2015 Feb;54(1):R15-29. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0203>.
722. Zeng R, Liu Z, Sun Y, Xu C. Differential expression and function of AR isoforms in prostate cancer. *Oncol Rep.* 2012 Feb;27(2):492-8. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1516>.

723. Shiota M, Yokomizo A, Naito S. Oxidative stress and androgen receptor signaling in the development and progression of castration-resistant prostate cancer. *Free Radic Biol Med.* 2011 Oct 1;51(7):1320-8. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.011>.
724. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju BG, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell.* 2009 Dec 11;139(6):1069-83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.030>.
725. Tuna M, Amos CI, Mills GB. Molecular mechanisms and pathobiology of oncogenic fusion transcripts in epithelial tumors. *Oncotarget.* 2019 Mar12;10(21):2095-2111. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26777>.
726. Heidegger I, Kern J, Ofer P, Klocker H, Massoner P. Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis. *Oncotarget.* 2014 May 15;5(9):2723-35.
727. Setlur SR, Mertz KD, Hoshida Y, Demichelis F, Lupien M, Perner S, et al. Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Jun 4;100(11):815-25. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn150>.
728. Sackmann-Sala L, Goffin V. Prolactin-induced prostate tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2015;846:221-42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_10.
729. Kambale PR, Haldar D, Kabi BC, Kambale KP. Study of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism (FokI, TaqI and ApaI) Among Prostate Cancer Patients in North India. *J Clin Diagn Res.* 2017 Jun;11(6):BC05-BC08. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24290.9976>.
730. Gerashchenko GV, Mevs LV, Chashchina LI, Pikul MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, et al. Expression of steroid and peptide hormone receptors, metabolic enzymes and EMT-related genes in prostate tumors in relation to the presence of the TMPRSS2/ERG fusion. *Exp Oncol.* 2018 Jun;40(2):101-108.
731. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015 Aug;29(4):557-68. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>.

732. Isikbay M, Otto K, Kregel S, Kach J, Cai Y, Vander Griend DJ, et al. Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Horm Cancer*. 2014 Apr;5(2):72-89. <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0173-2>.
733. Kach J, Long TM, Selman P, Tonsing-Carter EY, Bacalao MA, Lastra RR, et al. Selective Glucocorticoid Receptor Modulators (SGRMs) Delay Castrate-Resistant Prostate Cancer Growth. *Mol Cancer Ther*. 2017 Aug;16(8):1680-1692. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0923>.
734. Samani A, Yakar S, Le Roith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 2007; 28: 20–47.
735. Roberts JM, Martin RS, Piyarathna DB, MacKrell JG, Rocha GV, Dodge JA, et al. Vitamin D receptor activation reduces VCaP xenograft tumor growth and counteracts ERG activity despite induction of TMPRSS2:ERG. *Oncotarget*. 2017 Jul 4;8(27):44447-44464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17968>.
736. Audet-Walsh É, Yee T, Tam IS, Giguère V. Inverse Regulation of DHT Synthesis Enzymes 5 α -Reductase Types 1 and 2 by the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrinology*. 2017 Apr 1;158(4):1015-1021. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1926>.
737. Gerashchenko G, Rozenberg Y, Mevs L, Pikul M, Gryzodub O, Stakhovsky E, et al. Expression profiling of prostate tumor specific genes. Symposium and summer school “Fundamental principles of cancer biotherapy”, May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine, *Exp Oncol*. 2018;40(2):158-9.
738. O'Sullivan CC, Bates SE. Targeting Prolactin Receptor (PRLR) Signaling in PRLR-Positive Breast and Prostate Cancer. *Oncologist*. 2016 May;21(5):523-6. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0108>.
739. Sackmann-Sala L, Chiche A, Mosquera-Garrote N, Boutillon F, Cordier C, Pourmir I, et al. Prolactin-induced prostate tumorigenesis links sustained Stat5 signaling with the amplification of basal/stem cells and emergence of putative luminal progenitors. *Am J Pathol*. 2014Nov;184(11):3105-19. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.07.020>.

740. Roy M, Kung HJ, Ghosh PM. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):542-61.
741. Cruz PM, Mo H, McConathy WJ, Sabnis N, Lacko AG. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Front Pharmacol.* 2013 Sep 25;4:119. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00119>.
742. Casals N, Zammit V, Herrero L, Fadó R, Rodríguez-Rodríguez R, Serra D. Carnitine palmitoyltransferase 1C: From cognition to cancer. *Prog Lipid Res.* 2016 Jan;61:134-48. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.11.004>.
743. Roomets E, Kivelä T, Tyni T. Carnitine palmitoyltransferase I and Acyl-CoA dehydrogenase 9 in retina: insights of retinopathy in mitochondrial trifunctional protein defects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Apr;49(4):1660-4. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1094>.
744. Sanchez-Macedo N, Feng J, Faubert B, Chang N, Elia A, Rushing EJ, et al. Depletion of the novel p53-target gene carnitine palmitoyltransferase 1C delays tumor growth in the neurofibromatosis type I tumor model. *Cell Death Differ.* 2013 Apr;20(4):659-68. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.168>.
745. Nath A, Chan C. Genetic alterations in fatty acid transport and metabolism genes are associated with metastatic progression and poor prognosis of human cancers. *Sci Rep.* 2016 Jan 4;6:18669. <https://doi.org/10.1038/srep18669>.
746. Schlaepfer IR, Rider L, Rodrigues LU, Gijón MA, Pac CT, Romero L, et al. Lipid catabolism via CPT1 as a therapeutic target for prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014 Oct;13(10):2361-71. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0183>.
747. Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res.* 2006 Jun 15;66(12):5977-80.
748. Wu X, Daniels G, Lee P, Monaco ME. Lipid metabolism in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 2014 Jul 12;2(2):111-20.

749. Su CW, Zhang Y, Zhu YT. Stromal COX-2 signaling are correlated with colorectal cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016 Nov;107:33-38. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.08.010>.
750. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl:S29-34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800042-JLR200>.
751. Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res*. 2015 Feb 20;8:105-18. <https://doi.org/10.2147/JPR.S75160>.
752. Yang P, Cartwright CA, Li J, Wen S, Prokhorova IN, Shureiqi I, et al. Arachidonic acid metabolism in human prostate cancer. *Int J Oncol*. 2012 Oct;41(4):1495-503. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1588>.
753. Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2003 Mar 10;191(2):125-35.
754. Gerashchenko GV, Kononenko OA, Bondarenko YuM, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression patterns of genes that regulate lipid metabolism in prostate tumors. *Biopolym. Cell*. 2018; 34(6):445-460. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000990>.
755. Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence. *Clin Chem*. 2011 Oct;57(10):1366-75. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.165977>.
756. Khemlina G, Ikeda S, Kurzrock R. Molecular landscape of prostate cancer: implications for current clinical trials. *Cancer Treat Rev*. 2015 Nov;41(9):761-6. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.07.001>.
757. Ruggero K, Farran-Matas S, Martinez-Tebar A, Aytes A. Epigenetic Regulation in Prostate Cancer Progression. *Curr Mol Biol Rep*. 2018;4(2):101-115. <https://doi.org/10.1007/s40610-018-0095-9>.
758. Zahalka AH, Arnal-Estapé A, Maryanovich M, Nakahara F, Cruz CD, Finley LWS, et al. Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. *Science*. 2017 Oct 20;358(6361):321-326. <https://doi.org/10.1126/science.aah5072>.
759. Kluth LA, Shariat SF, Kratzik C, Tagawa S, Sonpavde G, Rieken M, et al. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis and prostate cancer: implications for androgen

- deprivation therapy. *World J Urol.* 2014Jun;32(3):669-76. <https://doi.org/10.1007/s00345-013-1157-5>.
760. Solomon I, Voiculescu VM, Caruntu C, Lupu M, Popa A, Ilie MA, et al. Neuroendocrine Factors and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: An Affair to Remember. *Dis Markers.* 2018May 8;2018:9787831. <https://doi.org/10.1155/2018/9787831>.
761. Todoric J, Antonucci L, Karin M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016 Dec;9(12):895-905.
762. Kwon OJ, Zhang L, Ittmann MM, Xin L. Prostatic inflammation enhances basal-to-luminal differentiation and accelerates initiation of prostate cancer with a basal cell origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Feb 4;111(5):E592-600. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318157111>.
763. Strasner A, Karin M. Immune Infiltration and Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2015 Jul 8;5:128. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00128>.
764. Sfanos KS, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol.* 2018 Jan;15(1):11-24. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.167>.
765. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2012 Oct 30;19(6):R187-204. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0085>.
766. Lorion R, Bladou F, Spatz A, van Kempen L, Irani J. [Prostate cancer microenvironment: Its structure, functions and therapeutic applications]. *Prog Urol.* 2016 Jun;26(8):464-76. <https://doi.org/10.1016/j.purol.2016.06.006>.
767. McCarthy JB, El-Ashry D, Turley EA. Hyaluronan, Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Microenvironment in Malignant Progression. *Front Cell Dev Biol.* 2018 May 8;6:48. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00048>.
768. Komohara Y, Takeya M. CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment. *J Pathol.* 2017 Feb;241(3):313-315. <https://doi.org/10.1002/path.4824>.

769. Dakhova O, Rowley D, Ittmann M. Genes upregulated in prostate cancer reactive stroma promote prostate cancer progression in vivo. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 1;20(1):100-9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1184>.
770. Attieh Y, Vignjevic DM. The hallmarks of CAFs in cancer invasion. *Eur J Cell Biol*. 2016 Nov;95(11):493-502. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.07.004>.
771. Maolake A, Izumi K, Shigehara K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, et al. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22-CCR4 axis. *Oncotarget*. 2017 Feb 7;8(6):9739-9751. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14185>.
772. Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jul;33(7):1478-83. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.300168>.
773. Danaher P, Warren S, Dennis L, D'Amico L, White A, Disis ML, et al. Gene expression markers of Tumor Infiltrating Leukocytes. *J Immunother Cancer*. 2017 Feb 21;5:18. <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0215-8>.
774. Rådestad E, Egevad L, Jorns C, Mattsson J, Sundberg B, Nava S, et al. Characterization of infiltrating lymphocytes in human benign and malignant prostate tissue. *Oncotarget*. 2017 Jul 24;8(36):60257-60269. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19528>.
775. Sutcliffe S, De Marzo AM, Sfanos KS, Laurence M. MSMB variation and prostate cancer risk: clues towards a possible fungal etiology. *Prostate*. 2014 May;74(6):569-78. <https://doi.org/10.1002/pros.22778>.
776. Langat DK, Sue Platt J, Tawfik O, Fazleabas AT, Hunt JS. Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. *J Reprod Immunol*. 2006 Aug;71(1):75-86.
777. Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014 Jul 28;211(8):1503-23. <https://doi.org/10.1084/jem.20140692>.

778. Runa F, Hamalian S, Meade K, Shisgal P, Gray PC, Kelber JA. Tumor microenvironment heterogeneity: challenges and opportunities. *Curr Mol Biol Rep*. 2017 Dec;3(4):218-229. <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0073-7>.
779. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Kononenko OA, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression pattern of genes associated with tumor microenvironment in prostate cancer. *Exp Oncol*. 2018 Dec;40(4):315-322.
780. Gerashchenko GV, Kashuba VI. Molecular characteristics of an interaction between prostate tumor cells and the host organism. XI PARNAS Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. *Ukr Biochem J*. 2018;90(Special Issue):73.
781. Reddy S, Ozgur K, Lu M, Chang W, Mohan SR, Kumar CC, et al. Structure of the human smooth muscle alpha-actin gene. Analysis of a cDNA and 5' upstream region. *J Biol Chem*. 1990 Jan 25;265(3):1683-7.
782. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schürch W, Gabbiani G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer*. 1988 May 15;41(5):707-12.
783. Orimo A, Weinberg RA. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther*. 2007 Apr;6(4):618-9.
784. Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)*. 2015 Dec 11;7(4):2443-58. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>.
785. Ireland LV, Mielgo A. Macrophages and Fibroblasts, Key Players in Cancer Chemoresistance. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Oct 9;6:131. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00131>.
786. Mukaida N, Sasaki S. Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World J Gastroenterol*. 2016 Jun 21;22(23):5301-16. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i23.5301>.
787. Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med*. 2013 Jan;13(1):24-57.

788. Fei F, Qu J, Zhang M, Li Y, Zhang S. S100A4 in cancer progression and metastasis: A systematic review. *Oncotarget*. 2017 May 19;8(42):73219-73239. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18016>.
789. Bresnick AR. S100 proteins as therapeutic targets. *Biophys Rev*. 2018 Dec;10(6):1617-1629. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0471-y>.
790. Hernández JL, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, et al. Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS One*. 2013 Sep 4;8(9):e72480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072480>.
791. Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumour Biol*. 2016 Sep;37(9):11611-11622.
792. True LD, Zhang H, Ye M, Huang CY, Nelson PS, von Haller PD, et al. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. *Mod Pathol*. 2010 Oct;23(10):1346-56. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.122>.
793. Shaikh MV, Kala M, Nivsarkar M. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target. *Cancer Biomark*. 2016;16(3):301-7. <https://doi.org/10.3233/CBM-160590>.
794. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335-48.
795. Augsten M, Hägglöf C, Olsson E, Stolz C, Tsagozis P, Levchenko T, et al. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3414-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813144106>.
796. Rodríguez-Nieves JA, Patalano SC, Almanza D, Gharaee-Kermani M, Macoska JA. CXCL12/CXCR4 Axis Activation Mediates Prostate Myofibroblast Phenoconversion through Non-Canonical EGFR/MEK/ERK Signaling. *PLoS One*. 2016 Jul 19;11(7):e0159490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159490>.

797. Ajduković J. HIF-1--a big chapter in the cancer tale. *Exp Oncol.* 2016 Mar;38(1):9-12.
798. Kim JY, Lee JY. Targeting Tumor Adaption to Chronic Hypoxia: Implications for Drug Resistance, and How It Can Be Overcome. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 25;18(9). pii: E1854. <https://doi.org/10.3390/ijms18091854>.
799. Rhim T, Lee DY, Lee M. Hypoxia as a target for tissue specific gene therapy. *J Control Release.* 2013 Dec 10;172(2):484-94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.021>.
800. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):378-89. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>.
801. Nie C, Lv H, Bie L, Hou H, Chen X. Hypoxia-inducible factor 1-alpha expression correlates with response to neoadjuvant chemotherapy in women with breast cancer. *Medicine (Baltimore).* 2018 Dec;97(51):e13551. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013551>.
802. Petrova V, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Amelio I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis.* 2018 Jan 24;7(1):10. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>.
803. Madsen CD, Pedersen JT, Venning FA, Singh LB, Moeendarbary E, Charras G, et al. Hypoxia and loss of PHD2 inactivate stromal fibroblasts to decrease tumour stiffness and metastasis. *EMBO Rep.* 2015 Oct;16(10):1394-408. <https://doi.org/10.15252/embr.201540107>.
804. Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, et al. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jun 7;91(12):5657-61.
805. Puré E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene.* 2018 Aug;37(32):4343-4357. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0275-3>.

806. Hou CM, Qu XM, Zhang J, Ding TT, Han W, Ji GC, et al. Fibroblast activation proteins- α suppress tumor immunity by regulating T cells and tumor-associated macrophages. *Exp Mol Pathol.* 2018 Feb;104(1):29-37. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.12.003>.
807. Wikberg ML, Edin S, Lundberg IV, Van Guelpen B, Dahlin AM, Rutegård J, et al. High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. *Tumour Biol.* 2013 Apr;34(2):1013-20. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0638-2>.
808. Pelekanou V, Villarroel-Espindola F, Schalper KA, Pusztai L, Rimm DL. CD68, CD163, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) co-localization in breast tumor microenvironment predicts survival differently in ER-positive and -negative cancers. *Breast Cancer Res.* 2018 Dec 17;20(1):154. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1076-x>.
809. Sun S, Pan X, Zhao L, Zhou J, Wang H, Sun Y. The Expression and Relationship of CD68-Tumor-Associated Macrophages and Microvascular Density With the Prognosis of Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2016 Sep;9(3):270-7. <https://doi.org/10.21053/ceo.2015.01305>.
810. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2012 Jul 23;12:306. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-306>.
811. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res.* 2016 Nov;39(11):1588-1596.
812. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegård J, Öberg Å, Oldenborg PA, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One.* 2012;7(10):e47045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047045>.
813. Almatroodi SA, McDonald CF, Darby IA, Pouniotis DS. Characterization of M1/M2 Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Th1/Th2 Cytokine Profiles in

Patients with NSCLC. *Cancer Microenviron.* 2016 Apr;9(1):1-11. <https://doi.org/10.1007/s12307-015-0174-x>.

814. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol.* 2017 Feb 28;10(1):58. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0430-2>.

815. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>.

816. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):787-91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>.

817. Kinoshita T, Imamura R, Kushiya H, Suda T. NLRP3 mediates NF- κ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. *PLoS One.* 2015 Mar 11;10(3):e0119179. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119179>.

818. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer.* 2018 Nov 17;17(1):158. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0900-3>.

819. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov 25;11(12):852-63. <https://doi.org/10.1038/nri3108>.

820. Kyi C, Postow MA. Immune checkpoint inhibitor combinations in solid tumors: opportunities and challenges. *Immunotherapy.* 2016 Jun;8(7):821-37. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0002>.

821. Ernstoff MS, Gandhi S, Pandey M, Puzanov I, Grivas P, Montero A, et al. Challenges faced when identifying patients for combination immunotherapy. *Future Oncol.* 2017 Aug;13(18):1607-1618. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0218>.

822. Niyongere S, Saltos A, Gray JE. Immunotherapy combination strategies (non-chemotherapy) in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2018 Feb;10(Suppl 3):S433-S450. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.12.120>.
823. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996 Mar 22;271(5256):1734-6.
824. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Tronik-Le Roux D, Moreau P, LeMaoult J. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol.* 2015;127:33-144. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2015.04.001>.
825. Swets M, König MH, Zaalberg A, Dekker-Ensink NG, Gelderblom H, van de Velde CJ, et al. HLA-G and classical HLA class I expression in primary colorectal cancer and associated liver metastases. *Hum Immunol.* 2016 Sep;77(9):773-9. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.03.001>.
826. Murdaca G, Calamaro P, Lantieri F, Pigozzi S, Mastracci L, Grillo F, et al. HLA-G expression in gastric carcinoma: clinicopathological correlations and prognostic impact. *Virchows Arch.* 2018 Oct;473(4):425-433. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2379-0>.
827. Lin A, Yan WH. Heterogeneity of HLA-G Expression in Cancers: Facing the Challenges. *Front Immunol.* 2018 Sep 27;9:2164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02164>.
828. da Silva IL, Montero-Montero L, Ferreira E, Quintanilla M. New Insights Into the Role of Qa-2 and HLA-G Non-classical MHC-I Complexes in Malignancy. *Front Immunol.* 2018 Dec 6;9:2894. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02894>.
829. Wang LH, Wang LL, Zhang J, Zhang P, Li SZ. [Th1/Th2 and Treg/Th17 cell balance in peripheral blood of patients with ovarian cancer]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2017 Aug 20;37(8):1066-1070.
830. Hirahara K, Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol.* 2016 Apr;28(4):163-71. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006>.

831. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*. 2012 Jan 3;10:1. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-1>.
832. Galon J, Bindea G, Mlecnik B, Angell H, Lagorce C, Toldosi AM, et al. [Intratumoral immune microenvironment and survival: the immunoscore]. *Med Sci (Paris)*. 2014 Apr;30(4):439-44. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004020>.
833. Garavelli S, De Rosa V, de Candia P. The Multifaceted Interface Between Cytokines and microRNAs: An Ancient Mechanism to Regulate the Good and the Bad of Inflammation. *Front Immunol*. 2018 Dec 21;9:3012. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03012>.
834. Sutcliffe S, De Marzo AM, Sfanos KS, Laurence M. MSMB variation and prostate cancer risk: clues towards a possible fungal etiology. *Prostate*. 2014 May;74(6):569-78. <https://doi.org/10.1002/pros.22778>.
835. Sjöblom L, Saramäki O, Annala M, Leinonen K, Nättinen J, Tolonen T, et al. Microseminoprotein-Beta Expression in Different Stages of Prostate Cancer. *PLoS One*. 2016 Mar 3;11(3):e0150241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150241>.
836. Deep G, Panigrahi GK. Hypoxia-Induced Signaling Promotes Prostate Cancer Progression: Exosomes Role as Messenger of Hypoxic Response in Tumor Microenvironment. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20(5-6): 419–434. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v20.i5-6.130>
837. Paller C, Pu H, Begemann DE, Wade CA, Hensley PJ, Kyprianou N. TGF- β receptor I inhibitor enhances response to enzalutamide in a pre-clinical model of advanced prostate cancer. *Prostate*. 2019 Jan;79(1):31-43. <https://doi.org/10.1002/pros.23708>.
838. Wang H, Song K, Sponseller TL, Danielpour D. Novel function of androgen receptor-associated protein 55/Hic-5 as a negative regulator of Smad3 signaling. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5154-62.
839. Webber JP, Spary LK, Mason MD, Tabi Z, Brewis IA, Clayton A. Prostate stromal cell proteomics analysis discriminates normal from tumour reactive stromal

- phenotypes. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):20124-39. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7716>.
840. Trabert B, Eldridge RC, Pfeiffer RM, Shiels MS, Kemp TJ, Guillemette C, et al. Prediagnostic circulating inflammation markers and endometrial cancer risk in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer (PLCO) screening trial. *Int J Cancer*. 2017 Feb 1;140(3):600-610. <https://doi.org/10.1002/ijc.30478>.
841. Liu Q, Russell MR, Shahriari K, Jernigan DL, Lioni MI, Garcia FU, et al. Interleukin-1 β promotes skeletal colonization and progression of metastatic prostate cancer cells with neuroendocrine features. *Cancer Res*. 2013 Jun 1;73(11):3297-305. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3970>.
842. Piechaczyk M, Blanchard JM. c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994 Oct;17(2):93-131.
843. Alfonso-Gonzalez C, Riesgo-Escovar JR. Fos metamorphoses: Lessons from mutants in model organisms. *Mech Dev*. 2018 Dec;154:73-81. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.006>.
844. Sharma NV, Pellegrini KL, Ouellet V, Giuste FO, Ramalingam S, Watanabe K, et al. Identification of the Transcription Factor Relationships Associated with Androgen Deprivation Therapy Response and Metastatic Progression in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018 Oct 11;10(10). pii: E379. <https://doi.org/10.3390/cancers10100379>.
845. Uluçkan Ö, Guinea-Viniegra J, Jimenez M, Wagner EF. Signalling in inflammatory skin disease by AP-1 (Fos/Jun). *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 92):S44-9.
846. Hao Y, Zhu L, Yan L, Liu J, Liu D, Gao N, et al. c-Fos mediates α 1, 2-fucosyltransferase 1 and Lewis y expression in response to TGF- β 1 in ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2017 Dec;38(6):3355-3366. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6052>.
847. Huang CY, Chang MC, Huang WY, Huang CT, Tang YC, Huang HD, et al. Urokinase-type plasminogen activator resulting from endometrial carcinogenesis enhances tumor invasion and correlates with poor outcome of endometrial carcinoma patients. *Sci Rep*. 2015 Jun 2;5:10680. <https://doi.org/10.1038/srep10680>.

848. Banyard J, Chung I, Migliozzi M, Phan DT, Wilson AM, Zetter BR, Bielenberg DR. Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC Cancer*. 2014 May 30;14:387. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-387>.
849. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Rosenberg EE, Bondarenko YuM, Kashuba EV, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors at mRNA and protein levels. *Biopolym. Cell*. 2019; 35(1):39-53.
850. Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):1011-25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025>.
851. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep*. 2014 Dec;15(12):1243-53. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.
852. Yadav SS, Stockert JA, Hackert V, Yadav KK, Tewari AK. Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol Oncol*. 2018 Aug;36(8):349-360. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.05.008>.
853. Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):108-116. <https://doi.org/10.1159/000477852>.
854. Wei L, Wang J, Lampert E, Schlanger S, DePriest AD, Hu Q, et al. Intratumoral and Intertumoral Genomic Heterogeneity of Multifocal Localized Prostate Cancer Impacts Molecular Classifications and Genomic Prognosticators. *Eur Urol*. 2017 Feb;71(2):183-192. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.07.008>.
855. Tosoian JJ, Antonarakis ES. Molecular heterogeneity of localized prostate cancer: more different than alike. *Transl Cancer Res*. 2017 Feb;6(Suppl 1):S47-S50. <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.02.17>.
856. Геращенко ГВ, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози. *Допов. Нац. акад. наук Укр*. 2018; 6:113-9. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.06.113>.
857. Gerashchenko G, Kashuba V. Molecular profiling of prostate tumors. “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2018”, 31

October-2 November, 2018, Prague, Czech Republic, Biological markers in fundamental and clinical medicine (collection of abstracts). 2018;2(2):25.

858. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rozenberg YE, Kashuba VI. TMRSS2-ERG dependent gene expression changes and possible fusion mechanism in prostate tumors. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, May15-16, Kyiv, Ukraine, Biopolym Cell. 2018;34(2):154.

859. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. 2010 Dec;1(12):1170-7. <https://doi.org/10.1177/1947601911407325>.

860. Ding Y, Wu H, Warden C, Steele L, Liu X, Iterson MV, et al. Gene Expression Differences in Prostate Cancers between Young and Old Men. *PLoS Genet*. 2016 Dec 27;12(12):e1006477. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006477>.

861. Геращенко ГВ, Григорук ОВ, Мевс ЛВ, Кашуба ВІ. PTEN- пов'язані зміни експресії генів у пухлинах передміхурової залози людини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2018; 22:113-9.

862. Lahdensuo K, Erickson A, Saarinen I, Seikkula H, Lundin J, Lundin M, et al. Loss of PTEN expression in ERG-negative prostate cancer predicts secondary therapies and leads to shorter disease-specific survival time after radical prostatectomy. *Mod Pathol*. 2016 Dec;29(12):1565-1574. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.154>.

863. Teixeira AA, Marchiò S, Dias-Neto E, Nunes DN, da Silva IT, Chackerian B, et al. Going viral? Linking the etiology of human prostate cancer to the PCA3 long noncoding RNA and oncogenic viruses. *EMBO Mol Med*. 2017 Oct;9(10):1327-1330. <https://doi.org/10.15252/emmm.201708072>.

864. Ortega-Molina A, Serrano M. PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Apr;24(4):184-9. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.002>.

865. Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):629-33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2488>.

866. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311>.
867. Zhao SG, Chang SL, Erho N, Yu M, Lehrer J, Alshalalfa M, et al. Associations of Luminal and Basal Subtyping of Prostate Cancer With Prognosis and Response to Androgen Deprivation Therapy. *JAMA Oncol.* 2017 Dec 1;3(12):1663-1672. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0751>.
868. Park JW, Lee JK, Phillips JW, Huang P, Cheng D, Huang J, et al. Prostate epithelial cell of origin determines cancer differentiation state in an organoid transformation assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Apr 19;113(16):4482-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603645113>.
869. Yang Z, Yu L, Wang Z. PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Chin J Cancer Res.* 2016 Feb;28(1):65-71. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2016.01.05>.
870. Prensner JR, Zhao S, Erho N, Schipper M, Iyer MK, Dhanasekaran SM, et al. RNA biomarkers associated with metastatic progression in prostate cancer: a multi-institutional high-throughput analysis of SChLAP1. *Lancet Oncol.* 2014 Dec;15(13):1469-80. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71113-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71113-1).
871. Ahrens-Fath I, Politz O, Geserick C, Haendler B. Androgen receptor function is modulated by the tissue-specific AR45 variant. *FEBS J.* 2005 Jan;272(1):74-84.
872. Smith BA, Sokolov A, Uzunangelov V, Baertsch R, Newton Y, Graim K, et al. A basal stem cell signature identifies aggressive prostate cancer phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24;112(47):E6544-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518007112>.
873. Deng J, Yang M, Jiang R, An N, Wang X, Liu B. Long Non-Coding RNA HOTAIR Regulates the Proliferation, Self-Renewal Capacity, Tumor Formation and Migration of the Cancer Stem-Like Cell (CSC) Subpopulation Enriched from Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2017 Jan 25;12(1):e0170860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170860>.
874. Zhang A, Zhao JC, Kim J, Fong KW, Yang YA, Chakravarti D, et al. LncRNA HOTAIR Enhances the Androgen-Receptor-Mediated Transcriptional Program and

Drives Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cell Rep.* 2015 Oct 6;13(1):209-221. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.069>.

875. Gerashchenko GV, Chashchina LI, Rynditch AV, Kashuba VI. The gene expression pattern as a tool for assessment of components of microenvironment and response to anti-cancer therapy of prostate tumors. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019;(4):86-93. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.04.086>.

876. Cruz JA, Wishart DS. Applications of machine learning in cancer prediction and prognosis. *Cancer Inform.* 2007 Feb 11;2:59-77.

877. Kourou K, Exarchos TP, Exarchos KP, Karamouzis MV, Fotiadis DI. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. *Comput Struct Biotechnol J.* 2014 Nov 15;13:8-17. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.005>.

878. Huang S, Cai N, Pacheco PP, Narrandes S, Wang Y, Xu W. Applications of Support Vector Machine (SVM) Learning in Cancer Genomics. *Cancer Genomics Proteomics.* 2018 Jan-Feb;15(1):41-51.

879. Rozenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. 2nd EACR Special Conference on Cancer Genomics, 28 June-01 July 2015, Cambridge, UK, EACR Conference Series. 2015:53.

880. Rozenberg EE, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Bondarenko YuN, Danilets RO, Kashuba VI. Prostate tumors characterization by NotI-microarrays. International scientific conference “Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer”, June 13-15, 2016, Kyiv, Ukraine, *Exp Oncol*, 2016;38(2):138.

881. Bellazzi R, Diomidous M, Sarkar IN, Takabayashi K, Ziegler A, McCray AT. Data analysis and data mining: current issues in biomedical informatics. *Methods Inf Med.* 2011;50(6):536-44. <https://doi.org/10.3414/ME11-06-0002>.

882. Gonzalez GH, Tahsin T, Goodale BC, Greene AC, Greene CS. Recent Advances and Emerging Applications in Text and Data Mining for Biomedical Discovery. *Brief Bioinform.* 2016 Jan;17(1):33-42. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv087>.

883. Li JR, Wang SS, Yang CK, Chen CS, Ho HC, Chiu KY, et al. First Line Androgen Deprivation Therapy Duration Is Associated with the Efficacy of Abiraterone Acetate Treated Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer after Docetaxel. *Front Pharmacol.* 2017 Feb 13;8:55. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00055>.
884. Aoun F, Bourgi A, Ayoub E, El Rassy E, van Velthoven R, Peltier A. Androgen deprivation therapy in the treatment of locally advanced, nonmetastatic prostate cancer: practical experience and a review of the clinical trial evidence. *Ther Adv Urol.* 2017 Mar 1;9(3-4):73-80. <https://doi.org/10.1177/1756287217697661>.
885. Shah H, Vaishampayan U. Therapy of Advanced Prostate Cancer: Targeting the Androgen Receptor Axis in Earlier Lines of Treatment. *Target Oncol.* 2018 Dec;13(6):679-689. <https://doi.org/10.1007/s11523-018-0611-0>.
886. Wise HM, Hermida MA, Leslie NR. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. *Clin Sci (Lond).* 2017 Feb 1;131(3):197-210. <https://doi.org/10.1042/CS20160026>.
887. Grünwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002 Nov 1;62(21):6141-5.
888. Matsumoto CS, Almeida LO, Guimarães DM, Martins MD, Papagerakis P, Papagerakis S, et al. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget.* 2016 Jul 5;7(27):42393-42407. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9877>.
889. Jamaspishvili T, Berman DM, Ross AE, Scher HI, De Marzo AM, Squire JA, et al. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2018 Apr;15(4):222-234. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2018.9>.
890. New Drugs at FDA: CDER's New Molecular Entities and New Therapeutic Biological Products. Retrieved from <https://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/druginnovation/default.htm>

891. Turanli B, Grøtli M, Boren J, Nielsen J, Uhlen M, Arga KY, et al. Drug Repositioning for Effective Prostate Cancer Treatment. *Front Physiol.* 2018 May 15;9:500. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00500>.
892. Hajar R. Statins: past and present. *Heart Views.* 2011 Jul;12(3):121-7. <https://doi.org/10.4103/1995-705X.95070>.
893. Kang M, Lee KH, Lee HS, Jeong CW, Ku JH, Kim HH, et al. Concurrent treatment with simvastatin and NF- κ B inhibitor in human castration-resistant prostate cancer cells exerts synergistic anti-cancer effects via control of the NF- κ B/LIN28/let-7 miRNA signaling pathway. *PLoS One.* 2017 Sep 14;12(9):e0184644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184644>.
894. Perroud HA, Alasino CM, Rico MJ, Mainetti LE, Queralt F, Pezzotto SM, et al. Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib: clinical outcomes and biomarkers of response. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016 Feb;77(2):365-74. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2947-9>.
895. Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol.* 2010 Apr;6(4):551-62. <https://doi.org/10.2217/fon.10.11>.
896. Soucek JJ, Davis AL, Hill TK, Holmes MB, Qi B, Singh PK, et al. Combination Treatment with Orlistat-Containing Nanoparticles and Taxanes Is Synergistic and Enhances Microtubule Stability in Taxane-Resistant Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Ther.* 2017 Sep;16(9):1819-1830. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0013>.
897. Wright C, Iyer AKV, Kaushik V, Azad N. Anti-Tumorigenic Potential of a Novel Orlistat-AICAR Combination in Prostate Cancer Cells. *J Cell Biochem.* 2017 Nov;118(11):3834-3845. <https://doi.org/10.1002/jcb.26033>.
898. Montironi R, Santoni M, Sotte V, Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, et al. Emerging Immunotargets and Immunotherapies in Prostate Cancer. *Curr Drug Targets.* 2016;17(7):777-82.

899. Lissoni P, Bignami A, Frontini L, Manganini V, Dapretto E, Gardani GS, et al. Possible involvement of prolactin in endocrine-resistant metastatic prostate cancer. *Int J Biol Markers*. 2005 Apr-Jun;20(2):123-5.
900. Goffin V. Prolactin receptor targeting in breast and prostate cancers: New insights into an old challenge. *Pharmacol Ther*. 2017 Nov;179:111-126. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.009>.
901. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncol Lett*. 2017 Sep;14(3):2611-2620. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6497>.
902. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell*. 2015 Apr 13;27(4):462-72. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.015>.
903. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev*. 2016 May 1;30(9):1002-19. <https://doi.org/10.1101/gad.279737.116>.
904. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Apr 1;99(Pt B):180-185. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.009>.
905. Dhingra N, Bhagwat D. Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment. *Indian J Pharmacol*. 2011 Feb;43(1):6-12. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.75657>.
906. Bettin A, Reyes I, Reyes N. Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer. *Int J Biol Markers*. 2016 May 28;31(2):e153-62. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000184>.
907. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Development of gene expression panels to determine prostate cancer. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr*. 2019;(1):100-6. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.100>
908. Peters DG, Kudla DM, Deloia JA, Chu TJ, Fairfull L, Edwards RP, et al. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian

- epithelium by serial analysis of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jul;14(7):1717-23.
909. Raymond JR Jr, Appleton KM, Pierce JY, Peterson YK. Suppression of GNAI2 message in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2014 Jan 14;7:6. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-6>.
910. de Lange R, Dimoudis N, Weidle UH. Identification of genes associated with enhanced metastasis of a large cell lung carcinoma cell line. *Anticancer Res.* 2003 Jan-Feb;23(1A):187-94.
911. Klimov EA, Selivanova NL, Razumnova GI, Rudko OI, Golovatenko-Abramov PK. RHOA, SEMA3B, and CKAP2 expression in leukaemia of different types: the results of a pilot experiment. *Folia Biol (Praha).* 2013;59(5):204-6.
912. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2649-56.
913. Janssen BJ, Malinauskas T, Weir GA, Cader MZ, Siebold C, Jones EY. Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Dec;19(12):1293-9. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2416>.
914. Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008 Aug;8(8):632-45. <https://doi.org/10.1038/nrc2404>.
915. Bender RJ, Mac Gabhann F. Expression of VEGF and semaphorin genes define subgroups of triple negative breast cancer. *PLoS One.* 2013 May 8;8(5):e61788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061788>.
916. Varshavsky A, Kessler O, Abramovitch S, Kigel B, Zaffryar S, Akiri G, et al. Semaphorin-3B is an angiogenesis inhibitor that is inactivated by furin-like proprotein convertases. *Cancer Res.* 2008 Sep 1;68(17):6922-31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5408>.
917. Joseph D, Ho SM, Syed V. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010 Feb;9(2):499-509. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0664>.

918. Ito M, Ito G, Kondo M, Uchiyama M, Fukui T, Mori S, et al. Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer letters*. 2005; 225(1): 131–9.
919. Nair PN, McArdle L, Cornell J, Cohn SL, Stallings RL. High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007; 174(2): 100–10.
920. Riquelme E, Tang M, Baez S, Diaz A, Pruyas M, Wistuba II, et al. Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma. *Cancer letters*. 2007; 250(1): 100–6.
921. Nair PN, McArdle L, Cornell J, Cohn SL, Stallings RL. High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007 Apr 15; 174(2): 100–10.
922. Anedchenko EA, Dmitriev AA, Krasnov GS, Kondrat'eva TT, Kopantsev EP, Vinogradova TV, et al. [Down-regulation of RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21, RASSF1A, ITGA9, HYAL1 and HYAL2 genes in non-small cell lung cancer]. *Mol Biol (Mosk)*. 2008 Nov-Dec; 42(6): 965–76.
923. Freking F, Ramachandran B, Schlinger BA. Regulation of aromatase, 5 alpha- and 5 beta-reductase in primary cell cultures of developing zebra finch telencephalon. *J Neurobiol*. 1998 Jul; 36(1): 30–40.
924. Aggarwal S, Singh M, Kumar A, Mukhopadhyay T. SRD5A2 gene expression inhibits cell migration and invasion in prostate cancer cell line via F-actin reorganization. *Mol Cell Biochem*. 2015 Oct; 408(1–2): 15–23. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2478-z>.
925. Smolle MA, Bauernhofer T, Pummer K, Calin GA, Pichler M. Current Insights into Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 22; 18(2). pii: E473. <https://doi.org/10.3390/ijms18020473>.
926. Sadowski MC, Pouwer RH, Gunter JH, Lubik AA, Quinn RJ, Nelson CC. The fatty acid synthase inhibitor triclosan: repurposing an anti-microbial agent for targeting prostate cancer. *Oncotarget*. 2014 Oct 15; 5(19): 9362–81.

927. Khiewkamrop P, Phunsomboon P, Richert L, Pekthong D, Srisawang P. Epistructured catechins, EGCG and EC facilitate apoptosis induction through targeting de novo lipogenesis pathway in HepG2 cells. *Cancer Cell Int.* 2018 Mar 21;18:46. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0539-6>.
928. Zhang N, Li S, Hua H, Liu D, Song L, Sun P, et al. Low density lipoprotein receptor targeted doxorubicin/DNA-Gold Nanorods as a chemo- and thermo-dual therapy for prostate cancer. *Int J Pharm.* 2016 Nov 20;513(1-2):376-386. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.002>.
929. Dheeraj A, Agarwal C, Schlaepfer IR, Raben D, Singh R, Agarwal R, et al. A novel approach to target hypoxic cancer cells via combining β -oxidation inhibitor etomoxir with radiation. *Hypoxia (Auckl).* 2018 Aug 21;6:23-33. <https://doi.org/10.2147/HP.S163115>.
930. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):142-56. <https://doi.org/10.1172/JCI38942>.
931. Ricciardi MR, Mirabilii S, Allegretti M, Licchetta R, Calarco A, Torrisi MR, et al. Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional preclinical effects in leukemias. *Blood.* 2015 Oct 15;126(16):1925-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-617498>.
932. Stopsack KH, Gerke TA, Andr n O, Andersson SO, Giovannucci EL, Mucci LA, Rider JR. Cholesterol uptake and regulation in high-grade and lethal prostate cancers. *Carcinogenesis.* 2017 Aug 1;38(8):806-811. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx058>.
933. Kong Y, Cheng L, Mao F, Zhang Z, Zhang Y, Farah E, et al. Inhibition of cholesterol biosynthesis overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *J Biol Chem.* 2018 Sep 14;293(37):14328-14341. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004442>.

934. Ramadan WH, Kabbara WK, Al Basiouni Al Masri HS. Enzalutamide for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Onco Targets Ther.* 2015 Apr 17;8:871-6. <https://doi.org/10.2147/OTT.S80488>.
935. Yang Z, Peng YC, Gopalan A, Gao D, Chen Y, Joyner AL. Stromal hedgehog signaling maintains smooth muscle and hampers micro-invasive prostate cancer. *Dis Model Mech.* 2017 Jan 1;10(1):39-52. <https://doi.org/10.1242/dmm.027417>.
936. Yang X, Lin Y, Shi Y, Li B, Liu W, Yin W, et al. FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3-CCL2 Signaling. *Cancer Res.* 2016 Jul 15;76(14):4124-35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2973>.
937. Ao Z, Shah SH, Machlin LM, Parajuli R, Miller PC, Rawal S, et al. Identification of Cancer-Associated Fibroblasts in Circulating Blood from Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res.* 2015 Nov 15;75(22):4681-7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1633>.
938. McCarthy JB, El-Ashry D, Turley EA. Hyaluronan, Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Microenvironment in Malignant Progression. *Front Cell Dev Biol.* 2018 May 8;6:48. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00048>.
939. Hu W, Qian Y, Yu F, Liu W, Wu Y, Fang X, et al. Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2015; 10: 1390–6. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3400>
940. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res.* 2018 Jan 14;2018:8917804. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>.
941. Shi X, Shiao SL. The role of macrophage phenotype in regulating the response to radiation therapy. *Transl Res.* 2018 Jan;191:64-80. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.11.002>.
942. Graff JN, Puri S, Bifulco CB, Fox BA, Beer TM. Sustained complete response to CTLA-4 blockade in a patient with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014 May;2(5):399-403. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0193>.

943. Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Douglas T, Champagne C, Morizot A, Saleh M. The Interleukin (IL)-1R1 pathway is a critical negative regulator of PyMT-mediated mammary tumorigenesis and pulmonary metastasis. *Oncoimmunology*. 2017 Feb 6;6(3):e1287247. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1287247>.
944. Cheng L, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R. Anatomic, morphologic and genetic heterogeneity of prostate cancer: implications for clinical practice. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012 Nov;12(11):1371-4. <https://doi.org/10.1586/era.12.127>.
945. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med*. 2012 Jan 3;10:1. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-1>.
946. Galon J, Bindea G, Mlecnik B, Angell H, Lagorce C, Tosi AM, et al. [Intratumoral immune microenvironment and survival: the immunoscore]. *Med Sci (Paris)*. 2014 Apr;30(4):439-44. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143004020>.
947. Shtivelman E, Beer TM, Evans CP. Molecular pathways and targets in prostate cancer. *Oncotarget*. 2014 Sep 15;5(17):7217-59.
948. Guo J, Yang J, Zhang X, Feng X, Zhang H, Chen L, et al. A Panel of Biomarkers for Diagnosis of Prostate Cancer Using Urine Samples. *Anticancer Res*. 2018 Mar;38(3):1471-1477.
949. de la Taille A, Irani J, Graefen M, Chun F, de Reijke T, Kil P, et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol*. 2011 Jun;185(6):2119-25. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.01.075>.
950. Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, Morris DS, Wang L, Helgeson BE, et al. Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia*. 2006 Oct;8(10):885-8.
951. Xiao K, Guo J, Zhang X, Feng X, Zhang H, Cheng Z, et al. Use of two gene panels for prostate cancer diagnosis and patient risk stratification. *Tumour Biol*. 2016 Aug;37(8):10115-22. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4619-0>.

ДОДАТКИ

Додаток А.

Перелік наукових праць за темою дисертації.

1. Гордіюк ВВ, Геращенко ГВ, Скрипкіна ІЯ, Симончук ОВ, Павлова ТВ, Угрин ДД, Манжура ОП, Вакуленко ГО, Забаровський ЄР, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Виявлення епігенетичних і генетичних порушень та зміни експресії генів 3-ої хромосоми людини при раку яєчника. *Biopolym Cell*. 2008; 24(4):323-332. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007B0>
2. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Skrypkina IY, Kvasha SM, Kolesnik OO, Ugryn DD, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2009 Jul-Aug;81(4):81-7.
3. Gerashchenko GV, Bogatyrova OO, Rudenko EE, Kondratov AG, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Vozianov OF, Pavlova TV, Zabarovsky ER, Rynditch AV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of NKIRAS1 gene in human renal cell carcinomas. *Exp Oncol*. 2010 Jul;32(2):71-5.
4. Руденко ЄЄ, Геращенко ГВ, Гордіюк ВВ, Кондратов АГ, Кашуба ВІ. PPM1M як потенційний ген супресор росту пухлин у світлоклітинних карциномах нирки людини. *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр.* 2011; 11:522-26.
5. Kondratov AG, Stoliar LA, Kvasha SM, Gordiyuk VV, Zgonnyk YM, Gerashchenko AV, Vozianov AF, Rynditch AV, Zabarovsky ER, Kashuba VI. Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas. *Mol Med Rep*. 2012 Feb;5(2):509-12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.681>.
6. Kashuba V, Dmitriev AA, Krasnov GS, Pavlova T, Ignatjev I, Gordiyuk VV, Gerashchenko AV, Braga EA, Yenamandra SP, Lerman M, Senchenko VN,

Zabarovsky E. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct 18;13(10):13352-77. <https://doi.org/10.3390/ijms131013352>.

7. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Bogatyrova OO, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. Genetic and epigenetic changes of *GPX1* and *GPX3* in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell.* 2013; 29(5):395-401. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00082F>

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

9. Розенберг СЕ, Прудникова ТЮ, Геращенко ГВ, Григорь'єва ЕВ, Кашуба ВІ. Пошук генів – потенційних маркерів агресивності і метастазування раку простати людини. *Biopolym Cell.* 2013; 29(6):499-505. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000840>

10. Розенберг СЕ, Геращенко ГВ, Кашуба ВІ. Порівняльний аналіз експресії генів у нормальній клітинній лінії та у клітинних лініях раку простати людини. *Ukr.Biochem.J.* 2014; 86(2):119-28.

11. Rudenko EE, Gerashchenko GV, Lapska YV, Vozianov SO, Zgonnyk YM, Kashuba VI. *PPM1M* and *PRICKLE2* are potential tumor suppressor genes in human clear-cell renal cell carcinoma. *Biopolym Cell.* 2014; 30(3):229-233. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00089A>

12. Rudenko EE, Lapska YV, Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Vikarchuk MV, Kashuba VI. Heterozygous deletions are main cause of expression alterations of *PPM1M* and *PRICLE2* genes in human clear cell renal cell carcinomas. *Biopolym. Cell.* 2015; 31(1):29-33. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008C9>

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

14. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Chashchina LI, Kazubskaya TP, Kondratieva TT, Lerman MI, Angeloni D, Braga EA, Kashuba VI. Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 2015 May 11;10(5):e0123369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123369>.
15. Dmitriev AA, Rosenberg EE, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Pavlova TV, Kudryavtseva AV, Beniaminov AD, Belova AA, Bondarenko YN, Danilets RO, Glukhov AI, Kondratov AG, Alexeyenko A, Alekseev BY, Klein G, Senchenko VN, Kashuba VI. Identification of Novel Epigenetic Markers of Prostate Cancer by NotI-Microarray Analysis. *Dis Markers*. 2015; 2015:241301. <https://doi.org/10.1155/2015/241301>.
16. Rosenberg EE, Gerashchenko GV, Hryshchenko NV, Mevs LV, Nekrasov KA, Lytvynenko RA, Vitruk YV, Gryzodub OP, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. *Exp Oncol*. 2017 Jul; 39(2):131-137.
17. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Vozianov SO, Stakhovsky EA, Kashuba VI. Detection of prostate specific ETS fusion transcripts in cancer samples. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(4):256-267. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000958>
18. Gerashchenko GV, Mankovska OS, Dmitriev AA, Mevs LV, Rosenberg EE, Pikul MV, Marynychenko MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related genes in prostate tumours. *Biopolym. Cell*. 2017; 33(5):335-355. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.00095E>
19. Gerashchenko GV, Stakhovsky EO, Chashchina LI, Gryzodub OP, Kashuba VI. A role of expression level of reference and investigated genes in prostate tumors for qPCR analysis. *Biopolym Cell*. 2018; 34(2):85-96. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000973>
20. Геращенко ГВ, Риндич АВ, Кашуба ВІ. Молекулярне профілювання пухлин передміхурової залози. *Допов. Нац. акад. наук Укр*. 2018; 6:113-9. <https://doi.org/10.15407/dopovidy2018.06.113>

21. Gerashchenko GV, Mevs LV, Chashchina LI, Pikul MV, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression of steroid and peptide hormone receptors, metabolic enzymes and EMT-related genes in prostate tumors in relation to the presence of the TMPRSS2/ERG fusion. *Exp Oncol.* 2018 Jun;40(2):101-108.
22. Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Kashuba VI. Genetic and epigenetic alterations of human chromosome 3, investigated by NotI-microarrays in seven types of epithelial cancers. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(4):303-312. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000983>
23. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Kononenko OA, Gryzodub OP, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression pattern of genes associated with tumor microenvironment in prostate cancer. *Exp Oncol.* 2018 Dec;40(4):315-322.
24. Gerashchenko GV, Kononenko OA, Bondarenko YuM, Stakhovsky EO, Kashuba VI. Expression patterns of genes that regulate lipid metabolism in prostate tumors. *Biopolym. Cell.* 2018; 34(6):445-460. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000990>
25. Геращенко ГВ, Григоруку ОВ, Мевс ЛВ, Кашуба ВІ. РТЕН- пов'язані зміни експресії генів у пухлинах передміхурової залози людини. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. 2018; 22:113-9.
26. Gerashchenko GV, Rynditch AV, Kashuba VI. Development of gene expression panels to determine prostate cancer. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019; (1):100-6. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.100>
27. Gerashchenko GV, Grygoruk OV, Rosenberg EE, Bondarenko YuM, Kashuba EV, Kashuba VI. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors at mRNA and protein levels. *Biopolym. Cell.* 2019; 35(1):39-53.
28. Gerashchenko GV, Chashchina LI, Rynditch AV, Kashuba VI. The gene expression pattern as a tool for assessment of components of microenvironment and response to anti-cancer therapy of prostate tumors. *Dopov. Nac. acad. Nauk Ukr.* 2019; (4):86-93. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.04.086>.

Апробація результатів дисертації:

29. Rosenberg E, Gerashchenko G, Kashuba V. Search for potential biomarkers of prostate cancer. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів. Львів. 2014. 8-11 квітня., 2014; Збірник тез:230-231.
30. Rosenberg E., Gerashchenko G, Kashuba V. Effect of D-Glucuronyl C5-Epimerase expression in prostate cancer cell lines. XI Український біохімічний конгрес 6-10 жовтня 2014 р., м.Київ, Україна. Ukr Biochem J. 2014; 86(5):29, Suppl. 2.
31. Dmitriev AA, Krasnov GS, Kudryavtseva AV, Snezhkina AV, Gerashchenko AV, Rudenko EE, Rosenberg EE, Puzanov GA, Puzanov MA, Alekseev BY, Senchenko VN, Kashuba VI. Comparative analysis of methylation/deletion patterns of chromosome 3 in different cancer types using NotI-microarrays. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 30 Aug - 4 Sept 2014. FEBS Journal. 2014;281(Suppl. 1):297-98. <https://doi.org/10.1111/febs.12919>
32. Rozenberg E, Gerashchenko G, Gordiyuk V, Danilets R, Kashuba V. Genetic and epigenetic changes in prostate tumors. 2nd EACR Special Conference on Cancer Genomics, 28 June-01 July 2015, Cambridge, UK, EACR Conference Series. 2015:53.
33. Розенберг ЄЕ, Кашуба ВІ, Геращенко ГВ, Литвіненко РА, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО. Експресія пухлино-асоційованих генів при раку передміхурової залози. XIII з'їзд онкологів та радіологів України 26-28 травня 2016, Київ, Україна. Укр. Радіол. журнал. 2016;Додаток 1:114-115.
34. Rozenberg EE, Gerashchenko GV, Gordiyuk VV, Bondarenko YuN, Danilets RO, Kashuba VI. Prostate tumors characterization by NotI-microarrays. International scientific conference “Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer”, June 13-15, 2016, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol, 2016;38(2):138.
35. Rozenberg E, Gerashchenko G, Hryshchenko N, Lytvinenko N, Vitruk Yu, Gryzodub O, Stakchovsky E, Kashuba V. Expression of cancer-associated genes in prostate tumors. Mini-symposium “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines” May 11, 2017 Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2017;39(2):157–160.

36. Mevs LV, Gerashchenko GV, Rozenberg YE, Kashuba VI. TMRSS2-ERG dependent gene expression changes and possible fusion mechanism in prostate tumors. XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, May15-16, Kyiv, Ukraine, Biopolym Cell. 2018;34(2):154.
37. Gerashchenko G, Rozenberg Y, Mevs L, Pikul M, Gryzodub O, Stakhovsky E, Kashuba V. Expression profiling of prostate tumor specific genes. Symposium and summer school “Fundamental principles of cancer biotherapy”, May 21-23, 2018, Kyiv, Ukraine, Exp Oncol. 2018;40(2):158-9.
38. Gerashchenko GV, Kashuba VI. Molecular characteristics of an interaction between prostate tumor cells and the host organism. XI PARNAS Conference – Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”, September 3-5, 2018, Kyiv, Ukraine. Ukr Biochem J. 2018;90(Special Issue):73.
39. Gerashchenko G, Kashuba V. Molecular profiling of prostate tumors. “Modern Molecular-Biochemical Markers in Clinical and Experimental Medicine -2018”, 31 October-2 November, 2018, Prague, Czech Republic, Biological markers in fundamental and clinical medicine (collection of abstracts). 2018;2(2):25.

Додаток Б.

Таблиця Б.1.

Послідовності праймерів для визначення кількості копій генів та втрати гетерозиготності

<i>Ген</i>	Прямий праймер (5' - 3')	Зворотній праймер (5' - 3')
<i>NKIRAS1</i>	TGCAATTTGGAATGGAGTGT	CATTTCCCACTTTCCCCTAC
<i>PPM1M</i>	TCCGAATCCTGACAACCTC	CCGAATGCTGGAACCTA
<i>PRICKLE2</i>	ATGTTTGCTCCTGGTTTCA	ACTCAGACCCTCAGTTCAC
<i>TBP</i>	ATAAAGCAGCAGCAGGGTTT	AGTCAGTGTGGCAAACCTCG
<i>GPX1</i>	ACCAAACAACACACATAACACA	ATGAGGTGGGATTTTTAGGTTT
<i>GPX3</i>	GAGTTGAGGGTAAGTTGTGTTTGT	CCATCCATCTAAAATATCCAACACT
<i>GPX4</i>	GGGTTGGAAATTTTGGATTATGT	CCAAAACCATAATCAAAACTACAA
<i>COL2A1</i>	GTAATGTTAGGAGTATTTTGTGGGA	CTACCCCAAAAAA CCCAATCCTA
<i>GPX1</i>	Cy5GAAAACCTGCCTCTGCCACGTGACC	CGAGAAGGCATACACCGACTGGGC
<i>GPX3</i>	Cy5GATGTGAAGCCACTTCGTC	ATGGTGCTGGCCTGTCTAT

Таблиця Б.2.

Послідовності праймерів для секвенування та визначення метилювання

Назва	Послідовність	Довжина продукту п.н.
<i>FGF12</i> (бісульф. секв)	F:ACATTTTCTCCTTAGGACCAAGGGAAG R:CTGCAGCCTCCTCAAATTTTAGCACTGC	445
<i>SEMA3B</i> (бісульф. секв)	F: CCCCCACTCAATAATCCCTTT R: ATTTTGGGGTTGTTGGGGATT	330
<i>SEMA3B-M_1</i>	F: CCACTCCCGCCTAACTACCG R: ATCGTTCGTTCGTGTCGTAAGT	91
<i>SEMA3B-Um_1</i>	F: ACTCCACCTAACTACCA R: TATTGTTTGTGTTGTGTTGTA	90
<i>SEMA3B-M_2</i>	F: TGGTTAGGCGGGGTATTTTC R: TCAACAATAAAAACGAAAACG	133
<i>SEMA3B-Um_2</i>	F: GTGGTTAGGTGGGGTATTTTT R: ATCAACAATAAAAACAAAACA	135

Додаток В.

Таблиця В.1.

Послідовності праймерів для визначення відносної експресії генів

Ген	Прямий праймер	Зворотній праймер	Довжина продукта (п.н.)
<i>EFNA5</i>	5'-CTGGATGTGTGTGTTTCAGCC-3'	5'-ATGGTAGTCACCCCTCTGGA-3'	106
<i>EPDR1</i>	5'-CTGCTTTCAGGACACTCATC-3'	5'-GCTGGCATTCTTCACTCTAC-3'	146
<i>FOS</i>	5'-CTACCACTCACCCGCAGACT-3'	5'-GTGGGAATGAAGTTGGCACT-3'	102
<i>IL1B</i>	5'-GAAGCTGATGGCCCTAAACA-3'	5'-AAGCCCTTGCTGTAGTGGTG-3'	110
<i>PLAU</i>	5'-CACACACTGCTTCATTGATTAC-3'	5'-CCACCTCAAACCTTCATCTCC-3'	104
<i>TAGLN</i>	5'-AAGAATGATGGGCACTACCG-3'	5'-ACTGATGATCTGCCGAGGTC-3'	186
<i>TGFBI</i>	5'-CCCTGGACACCAACTATTGC-3'	5'-CTTCCAGCCGAGGTCCTT-3'	92
<i>TBP</i>	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'	132

Додаток Г.

Таблиця Г.1.

Послідовності праймерів для визначення відносної експресії генів.

Гени	Прямий праймер (Forward primer) (5' – 3')	Зворотній праймер (Reverse primer) (5' – 3')	Довжи- на продук- ту (п.н.)
<i>ACTA2</i>	CAGCCAAGCACTGTCAGG	CCAGAGCCATTGTCACACAC	91
<i>AR 1 isof</i>	CCACTTGTGTCAAAAGCGAA	AGGTCTTCTGGGGTGGAAAG	129
<i>AR 2 isof</i>	AACGAATGCAGAGTGCTCCT	AGGTCTTCTGGGGTGGAAAG	125
<i>CASP3</i>	GAGGCCGACTTCTTGTATGC	CGGTTAACCCGGGTAAGAAT	155
<i>CCL17</i>	GGCTTCTCTGCAGCACATC	GCTTTCTAAGGGGAATGGCT	95
<i>CCL22</i>	CGCGTGGTGAAACACTTCTA	GGATCGGCACAGATCTCCT	95
<i>CCR4</i>	CACAGACCTTCCTCAGAGCC	CTTTCATCGAGGGTGGTGTC	129
<i>CD163</i>	TGAGCCACACTGAAAAGGAA	GGTGAATTTCTGCTCCATTCA	103
<i>CD68</i>	TTCACCAGCTGTCCACCTC	CACTGGGGCAGGAGAAACT	98
<i>CDH1</i>	GCCGAGAGCTACACGTTTAC	GTCGAGGGAAAAATAGGCTG	117
<i>CDH2</i>	GTGCATGAAGGACAGCCTCT	AGCTTCTCACGGCATAACACC	133
<i>CIAS1</i>	AGCCACGCTAATGATCGACT	TTCTTGGCATATCACAGTGG	169
<i>COX2</i>	CCCTCAGACAGCAAAGCCTA	GGTGGGAACAGCAAGGATT	123
<i>CPT1C</i>	AGATCTACCTCTCTGGCCTGC	GGATGGCACTGAAGAGGAAA	120
<i>CTLA4</i>	CTCAGCTGAACCTGGCTACC	CACACACAAAGCTGGCGAT	144
<i>CTGF</i>	CAGGCTAGAGAAGCAGAGCC	TGGAGATTTTGGGAGTACGG	107
<i>CXCL12</i>	TTGACCCGAAGCTAAAGTGG	TGGGCTCCTACTGTAAGGGTT	108
<i>CXCL14</i>	AAGCTGGAAATGAAGCCAAA	CAGTGCTCCTGACCTCGGTA	95
<i>ESR1</i>	AGGTGGACCTGATCATGGAG	AAGCTTCGATGATGGGCTTA	118
<i>ESR2</i>	ACCAAAGCATCGGTCACG	CATGATCCTGCTCAATTCCA	108
<i>FAP</i>	GCTGTGCTTGCCTTATTGGT	TCAGTGTGAGTGCTCTCATTGTAT	91
<i>FASN</i>	CTCCAGCCTCGCTCTCC	TGAGGTTGTCCAGAACTCC	135
<i>GCR AG</i>	CCCATTCTGACCACCCTTCTC	TGTAAGCACCACCTTCCTGTC	124
<i>GCR B</i>	GCCATTGTCAAGAGGGAAAGGA	TGTGTGAGATGTGCTTTCTGGT	123
<i>GCR ins</i>	TTTCTTCAAAGAGCAGTGGAAGG	CTTCCAGGTTCAATCCAGCCT	140
<i>HIF1A</i>	GAAGACATCGCGGGGAC	TGGCTGCATCTCGAGACTTT	105
<i>HMGCR</i>	TTCGGTGGCCTCTAGTGAGA	GATGGGAGGCCACAAAGAG	99
<i>HOTAIR</i>	CTTGATCCGAAAGCTTCCAC	TCCCCTACTGCAGGCTTCTA	212
<i>IGF1R</i>	GGCACAATTAAGTCTCCAAAGAC	CAAGGCCCTTTCTCCCCAC	173
<i>IL1R1</i>	AGCTGGACCCCTTGGTAAAA	TTCTTCACGTTCTTGCATTT	128
<i>IL1RL1</i>	TTATAGTGTGACGGCGACCA	GCCTTTTCCAAAACAAGCAG	154
<i>IL2RA</i>	ATACCTGCTGATGTGGGGAC	TAGGCCATGGCTTTGAATGT	114
<i>INSRA</i>	TTTTTCGTCCCCAGGCCATC	GTCACATTCCCAACATCGCC	108
<i>INSRB</i>	CCCCAGAAAAACCTCTTCAGG	GTCACATTCCCAACATCGCC	145
<i>IRF1</i>	GACCCTGGCTAGAGATGCAG	ATCCTTGTGATGTCCCAGC	128
<i>FN1</i>	CCATAAAGGGCAACCAAGAG	AAACCAATTCTTGGAGCAGG	142
<i>HLA-G</i>	CAGATACCTGGAGAACGGGA	CAGTATGATCTCCGCAGGGT	139
<i>KLRK1</i>	AAGGAAAGAAGAAGCTTGGGAAGA	CAAATGGCAACTTACAGCCA	131
<i>KRT18</i>	GGAGGCTGGAGAGCAAAATC	GTCAATCTGCAGAACGATGC	149
<i>LDLR</i>	CTGGAAATTGCGCTGGAC	GTCTTGGCACTGGAACTCGT	94
<i>MKI67</i>	CCTGTACGGCTAAAACATGGA	GCTGGCTCCTGTTTACGTA	128
<i>MMP2</i>	TTGCTGGAGACAAATTCTGG	AAGAAGTAGCTGTGACCGCC	148
<i>MMP9</i>	CGACGTCTTCCAGTACCGA	CTCAGGGCACTGCAGGAT	133
<i>MSMB</i>	AAGGAGTCTGCTTATCACAAATG	CCTGGTTGAATCTCCTGGAA	128

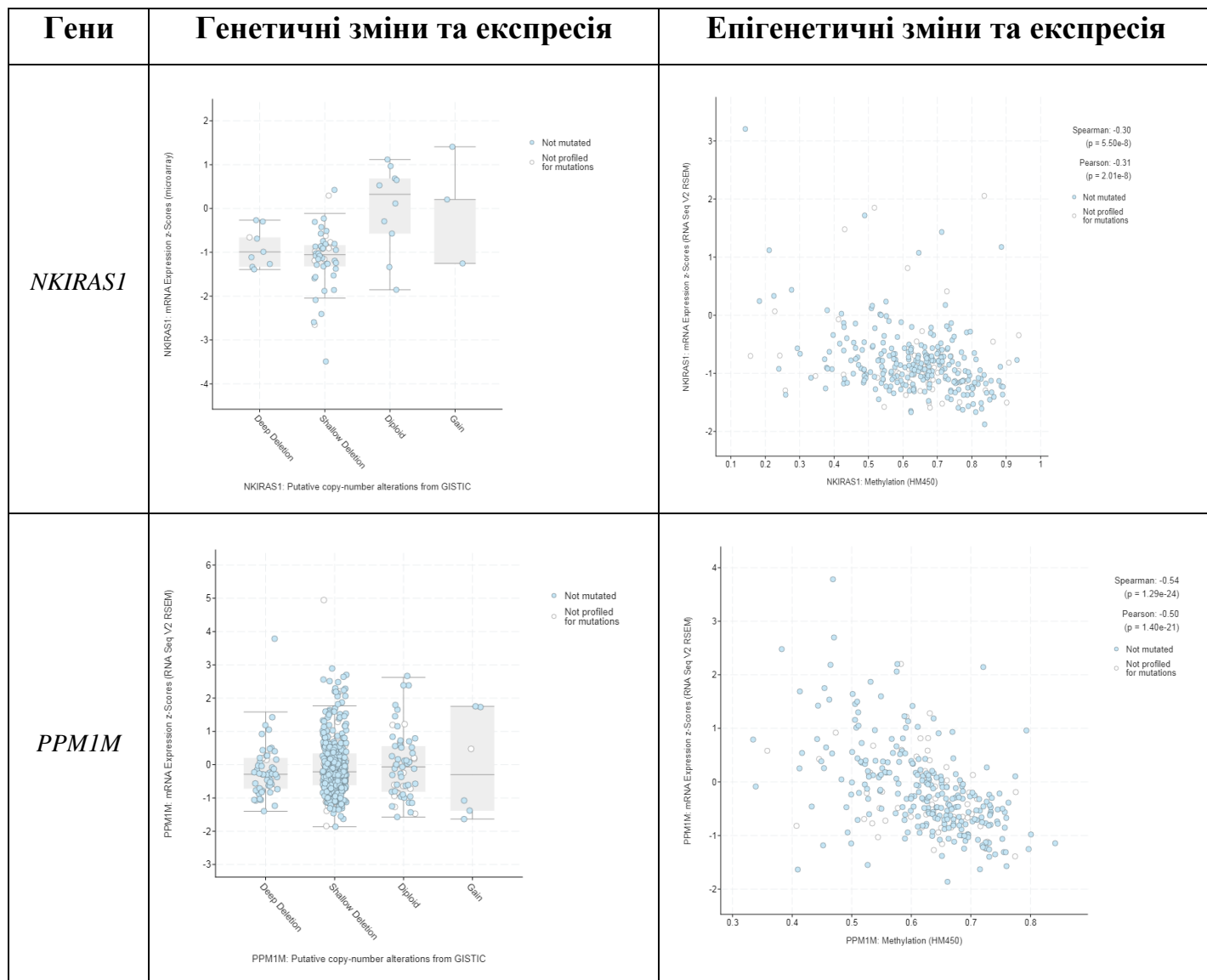
Продовж. табл. Г.1.

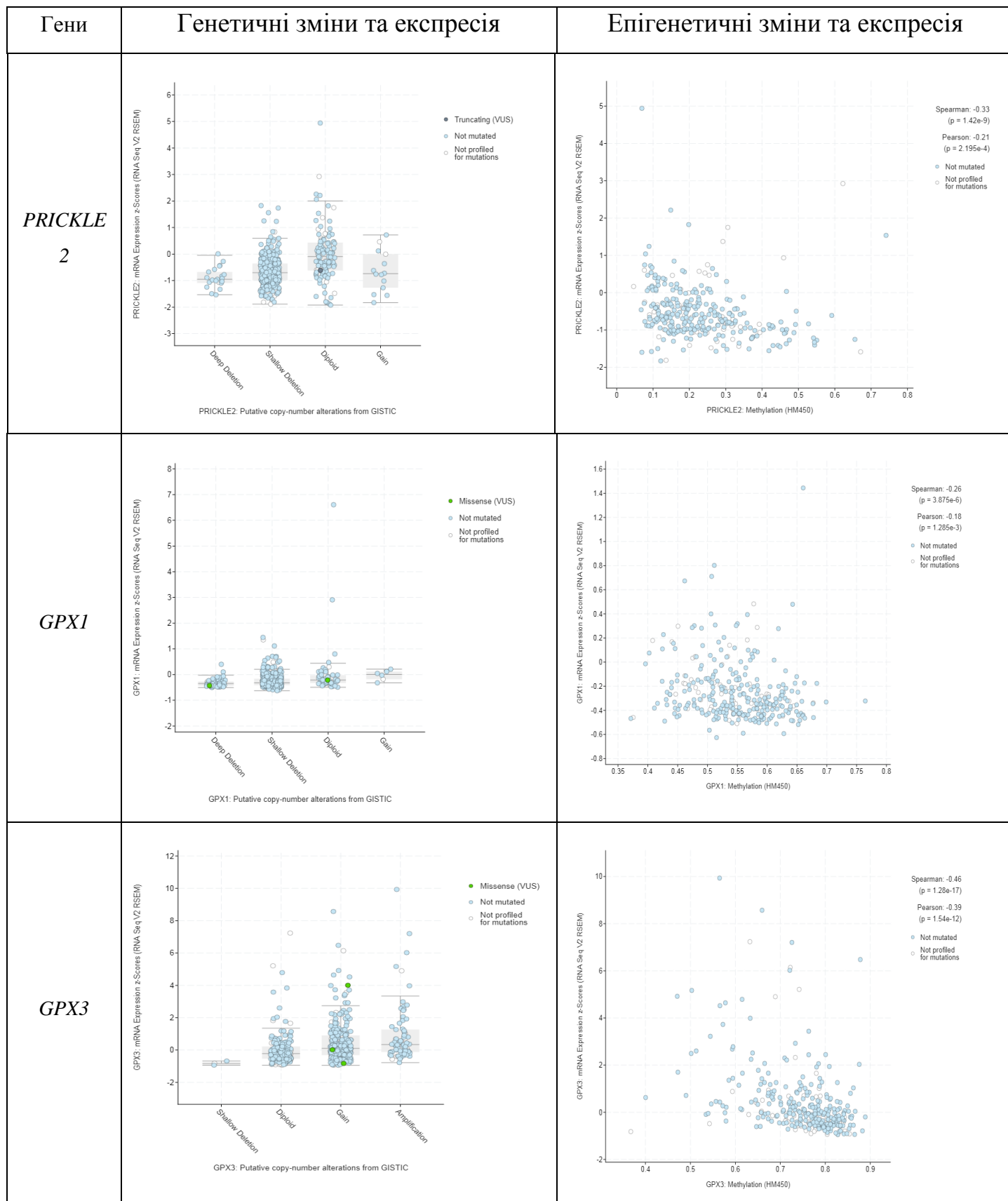
<i>Гени</i>	Прямий праймер (Forward primer) (5' – 3')	Зворотній праймер (Reverse primer) (5' – 3')	Довжи- на продук- ту (п.н.)
<i>NKX3-1</i>	CAGAGCCAGAGCCAGAGG	CAGATAAGACCCCAAGTGCC	137
<i>NOS2</i>	ATGCAATGAATGGGGAAAAA	ATTCTGCTGCTTGCTGAGGT	116
<i>OCLN</i>	TTTGTGGGACAAGGAACACA	ATGCCATGGGACTGTCAACT	137
<i>PCA3</i>	CAGAGGGGAGATTTGTGTGG	AGTCAGCAGCCTTTCTTATTC	269
<i>PRL</i>	ATTGAGGAGCAAACCAACG	ATGGAAGTCCCGACCAGAC	109
<i>PRLR1</i>	TGATGTGGCAGACTTTGCTC	ATGTTGGCTGCCTTCTCTTG	137
<i>PSA</i>	GTTGTCTTCCTCACCTGTCC	AGACTGCCCTGCCACGAGA	136
<i>PTEN</i>	TGAAGGCGTATACAGGAACAAT	GTCATAATGTCTTTCAGC	110
<i>S100A4</i>	ААСТАААГГАГСТГСТГАССС	TGTTGCTGTCCAAGTTGCTC	99
<i>SCHLAP1</i>	ААСССАССАГТТСТГГАСАС	TCACCGGACTCTGGTTCAAT	221
<i>SRD5A1</i>	СТАССАГТАСГССАГСГАГТ	ССААСАГТГГСАТАГГСТТТ	143
<i>SRD5A2</i>	АСГГАСТТСТГГГСССТСТТ	ААГГАСТССАТТТССАГТГС	135
<i>SEMA3B</i>	ССТСААССТГГАСААСАТСАГС	СГААГТТСАТГСАСТСАГТАССААТ	119
<i>THY1</i>	СГГААГАССССАГТССА	ГГГАГАССТГСААГАСТГТТ	94
<i>VDR</i>	ГААСАСТТГТССАСССГ	ГСАГГАААГТГГАГСССГАГ	97
<i>VIM</i>	ГАААТТГСАГАГАГАГАТГС	ГСАААГАТТССАСТТТГСГТ	122
<i>XIAP</i>	ГГАСССТССССТТГГАС	ССТТСАААСТГТТААААГТСАТСТТС	117
<i>TBP</i>	ТГСАСАГАГАССААГАГАТГАА	САСАТСАСАГСТССССАССА	132
<i>HPRT1</i>	ГТТАТГГСГАСССГСАГ	АСССТТТССАААТССТСАГС	107
<i>TUBA1B</i>	ССТТГССТССТААТСССТА	ТСТТГТСАСТТГГСАТСТГГ	147
<i>ALAS1</i>	СААААСТГССССААГАТГАТ	СТГТТГГАССТТГГСССТТАГ	141

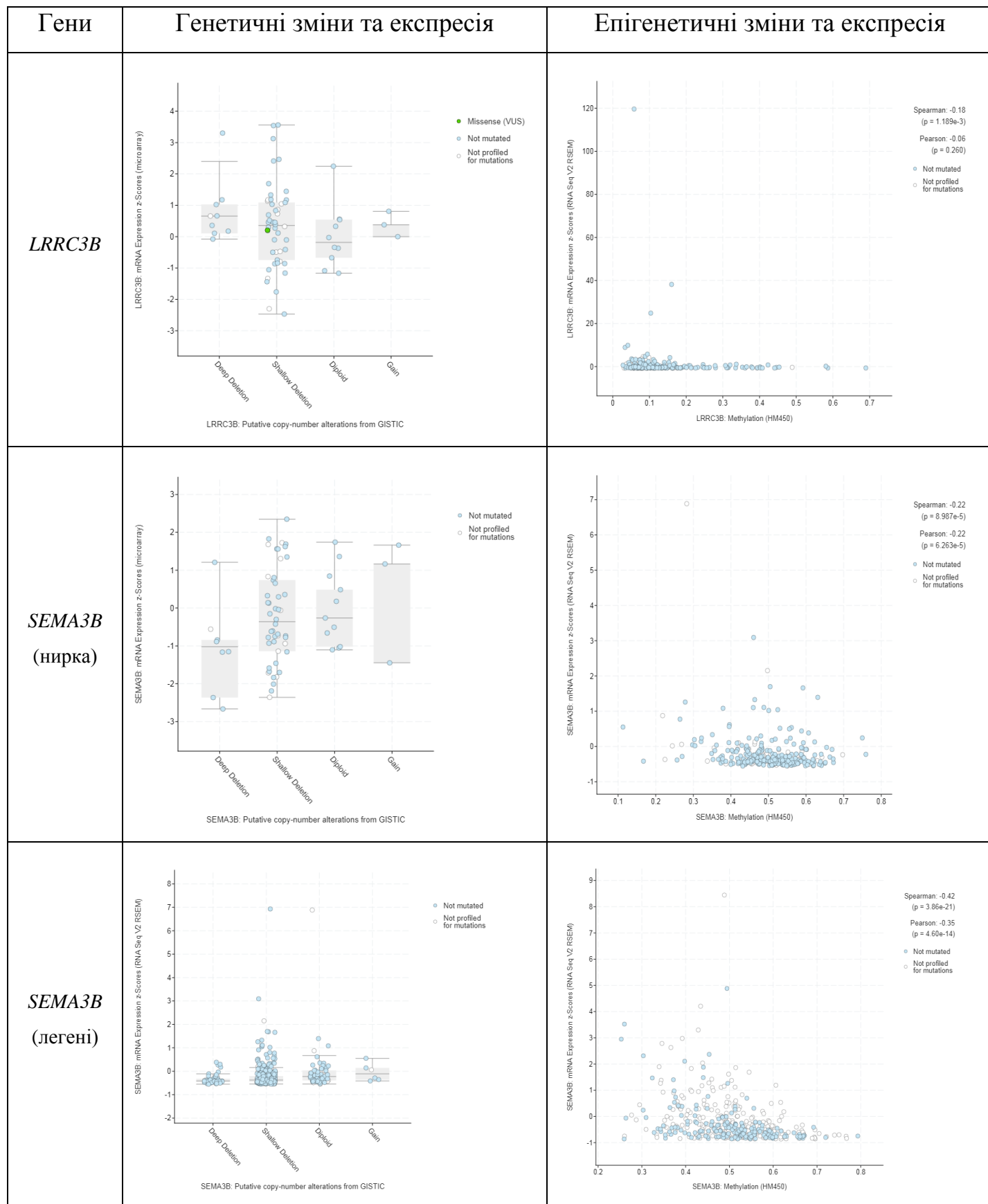
Додаток Д.

Таблиця Д.1.

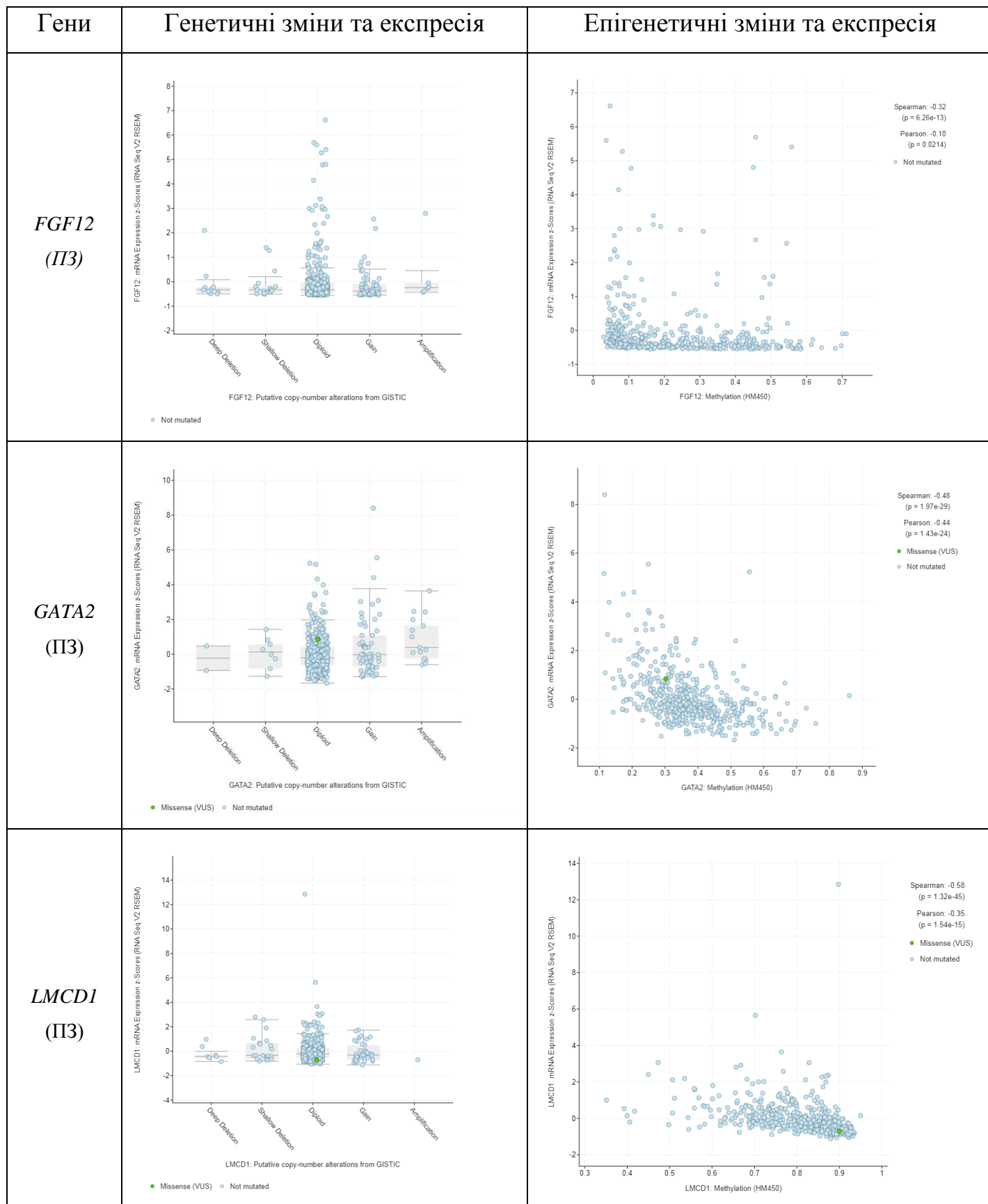
Генетичні, епігенетичні та експресійні порушення досліджуваних генів у
пухлинах нирки, легені, ПЗ за даними cBioportal [591-593]



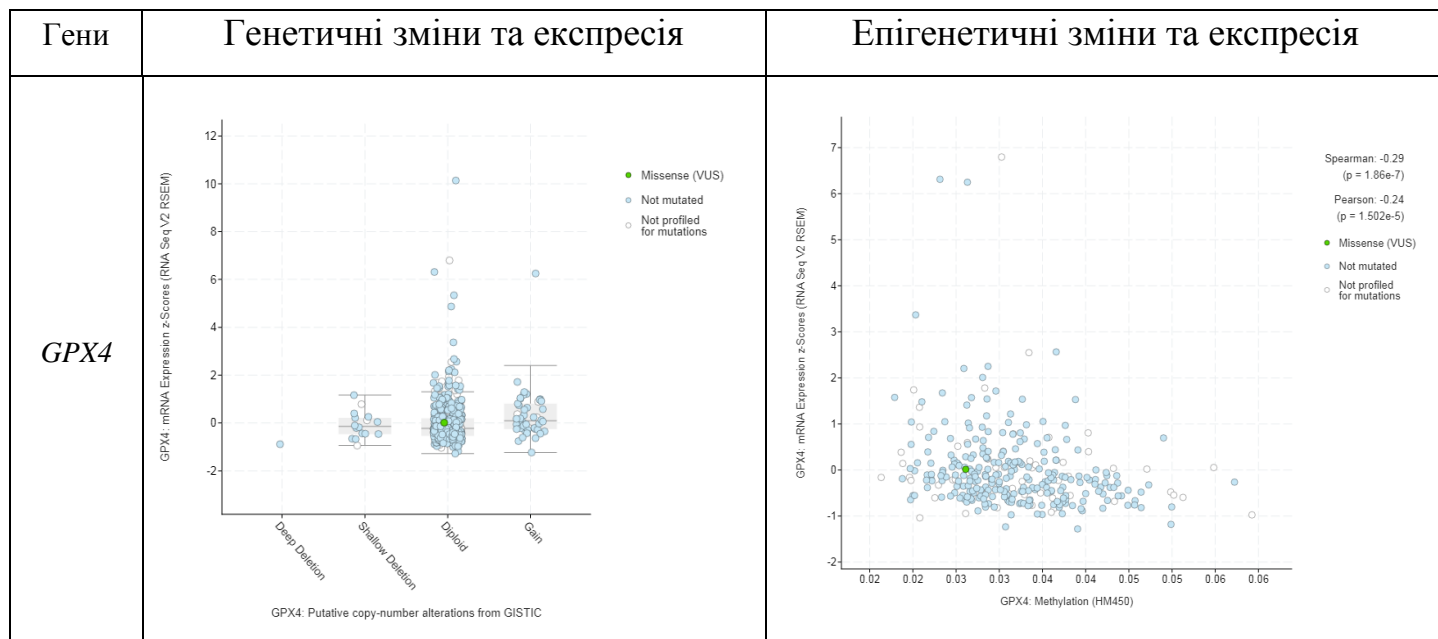




Продовж. табл. Д.1.



Продовж. табл. Д.1.



Додаток Е.

Таблиця Е.1.

Відмінності у кількості разів та р-рівні змін ВЕ між парами досліджуваних груп, за тестом Дана-Бонфероні для множинних порівнянь для трьох варіантів нормалізації та групуванні зразків ПНА

Група генів	Гени	Пари груп	Кількість разів			р-рівень		
			1 реф	2 реф	4 реф	1 реф	2 реф	4 реф
ПАФ	CXCL14	T/A	7,80	6,57	6,03	0,000	0,000	0,000
		T/N	3,26	2,32	2,27	0,011	0,019	0,025
		N/A	2,39	2,83	2,66	0,005	0,002	0,003
	CTGF	T/A	2,06	2,43	2,51	0,001	0,000	0,001
		T/N	1,58	1,51	1,50	0,036	0,041	0,055^{&}
	THY1	T/A	1,87	1,79	1,71	0,017	0,006	0,011
	CXCL12	T/A	0,35	0,39	0,45	0,000	0,000	0,000
		N/A	0,38	0,40	0,41	0,001	0,000	0,000
FAP	T/A	1,63	1,78	1,91	0,049	0,024	0,015	
ПАМ	CD163	T/A	2,14	1,68	1,39	0,045	0,129	0,250
	CCR4	T/A	0,57	0,56	0,54	0,037	0,009	0,002
		N/A	0,78	0,71	0,70	0,149	0,054^{&}	0,040
	CCL17	T/A	2,12	1,99	2,09	0,004	0,009	0,015
		N/A	1,77	1,71	1,51	0,016	0,038	0,065
ІАГ	IL1R1	T/A	0,69	0,52	0,51	0,031	0,023	0,005
	CTLA4	T/A	2,40	2,13	2,16	0,043	0,023	0,016
		N/A	2,72	3,12	2,61	0,001	0,002	0,003

Примітки: 1. [&] - статистично-значущі зміни з FDR=0.2; 2. червоний колір р-вірнів - $p < 0,05$ як статистино значущий; 3. р-рівень 0,000 – $p < 0,001$; 4. білі ячейки – середній рівень експресії генів; 5. рожеві ячейки – низько-експресовані гени

Додаток Ж.

Таблиця Ж.1.

Відмінності у кількості разів та р-рівні змін ВЕ між парами груп, за тестом Дана-Бонфероні для трьох варіантів нормалізації та з урахуванням стадій

Група генів	Гени	Пари груп	Кількість разів			р-рівень		
			1 реф	2 реф	4 реф	1 реф	2 реф	4 реф
ПАФ	CXCL14	T1-2/A	6,48	6,4	5,84	0	0	0
		T3-4/A	17,82	7,66	6,98	0	0	0
		N3-4/A	6,09	6,27	5,55	0,008	0,004	0,004
		T1-2/N1-2	3,56	2,75	2,66	0,036	0,06	0,089
	CTGF	T1-2/A	2,08	2,48	2,33	0,001	0,001	0,005
		T1-2/N3-4	3,31	2,22	2,06	0,001	0,006	0,028
	HIF1A	T1-2/T3-4	2,47	2,83	1,92	0,001	0,003	0,008
		T1-2/N3-4	2,65	3,03	2,14	0	0,001	0,001
		T3-4/A	0,43	0,4	0,49	0,012	0,012	0,01
		N1-2/N3-4	2,02	2,49	2,03	0,03	0,026	0,012
	N3-4/A	0,4	0,38	0,44	0,005	0,004	0,001	
	THY1	T1-2/A	1,69	2,28	1,8	0,026	0,013	0,041
	CXCL12	T1-2/A	0,46	0,41	0,41	0,002	0,001	0
		T3-4/A	0,41	0,41	0,47	0,008	0,028	0,034
		N1-2/A	0,54	0,45	0,43	0,022	0,011	0,001
N3-4/A		0,41	0,34	0,37	0,004	0,007	0,002	
FAP	T1-2/A	1,32	1,85	1,94	0,051 ^{&}	0,043	0,057 ^{&}	
ПАМ	CD68	T1-2/T3-4	4,51	2,96	2,75	0,056 ^{&}	0,021	0,082
		T1-2/N3-4	4,01	3,96	1,34	0,04	0,033	1
		T3-4/N1-2	0,22	0,34	0,34	0,111	0,048	0,166
	CD163	T1-2/T3-4	0,07	0,08	0,07	0,045	0,042	0,016
		T1-2/N3-4	0,1	0,11	0,09	0,114	0,083	0,05
		T3-4/A	17,8	17,13	17,51	0,002	0,005	0,005
		T3-4/N1-2	12,78	15,26	17,81	0,006	0,005	0,003
		N1-2/N3-4	0,11	0,1	0,07	0,019	0,011	0,01
		N3-4/A	12,84	11,42	13,46	0,006	0,011	0,017
	CCR4	T1-2/T3-4	2,55	2,08	1,99	0,06	0,049	0,062
		T3-4/A	0,26	0,34	0,34	0,002	0	0
		T3-4/N1-2	0,31	0,45	0,48	0,04	0,027	0,037
		N3-4/A	0,55	0,56	0,59	0,105	0,034	0,203

Продовж. табл. Ж.1.

Група генів	Гени	Пари груп	Кількість разів			p-рівень		
			1 реф	2 реф	4 реф	1 реф	2 реф	4 реф
ПАМ	<i>CCL17</i>	T1-2/N3-4	0,2	0,16	0,12	0,023	0,014	0,009
		T3-4/A	8,49	8,59	9,52	0,006	0,005	0,004
		T3-4/N1-2	7,12	7,41	8,82	0,113	0,050	0,023
		N1-2/N3-4	0,11	0,1	0,07	0,001	0,001	0,000
		N3-4/A	10,41	11,05	14,72	0,000	0,000	0,000
	<i>CCL22</i>	T1-2/T3-4	3	3,15	2,7	0,004	0,006	0,044
		T1-2/A	1,93	2,19	2,32	0,012	0,025	0,039
		T3-4/N1-2	0,41	0,39	0,47	0,015	0,032	0,156
	<i>NOS2A</i>	T3-4/N1-2	0,16	0,23	0,16	0,014	0,013	0,008
		N1-2/N3-4	5,12	5,73	4,63	0,039	0,047	0,125
ІАГ	<i>IL1R1</i>	T3-4/A	0,32	0,26	0,27	0,086	0,039	0,007
		N3-4/A	0,51	0,54	0,37	0,237	0,178	0,014
	<i>CTLA4</i>	T1-2/A	2,33	2,32	2,25	0,127	0,047	0,047
		N1-2/A	2,65	2,85	2,49	0,021	0,016	0,022
		N3-4/A	3,78	3,81	3,09	0,028	0,077	0,113

Примітки: 1. * - статистично-значущі зміни з FDR=0.2; 2. червоний колір p-вірнів - $p < 0,05$ як статистино значущий; 3. p-рівень 0,000 – $p < 0,001$; 4. білі ячейки – середній рівень експресії генів; 5. рожеві ячейки – низько-експресовані гени

Додаток З.

Таблиця 3.1.

Відмінності у кількості разів та р-рівні змін ВЕ між парами груп, за тестом Дана-Бонфероні для трьох варіантів нормалізації та з урахуванням СГ

Група генів	Гени	Пари груп	Кількість разів			р-рівень		
			1 реф	2 реф	4 реф	1 реф	2 реф	4 реф
ПАФ	CXCL14	T<7/A	4,47	4,86	3,74	0,022	0,016	0,058
		T=7/A	7,91	6,57	6,27	0,000	0,000	0,000
		T>7/A	8,61	8,07	7,56	0,000	0,000	0,000
		N>7/A	4,22	4,80	4,43	0,017	0,007	0,008
	CTGF	T<7/A	3,12	4,07	3,13	0,041	0,022	0,098
		T=7/A	3,19	2,87	2,57	0,005	0,011	0,027
		T=7/N>7	2,57	2,00	1,75	0,019	0,099	0,176
	HIF1A	T=7/T>7	2,45	2,36	2,14	0,001	0,002	0,004
		T=7N>7	1,97	2,03	2,09	0,001	0,004	0,006
	THY1	T<7/A	1,96	2,59	1,78	0,078	0,026	0,098
	CXCL12	T<7/A	0,56	0,56	0,48	0,222	0,176	0,009
		T=7/A	0,31	0,38	0,29	0,118	0,073	0,003
		T>7/A	0,33	0,37	0,43	0,001	0,001	0,001
		N=7/A	0,32	0,36	0,35	0,15	0,146	0,035
		N>7/A	0,34	0,35	0,37	0,004	0,003	0,001
ПАМ	CCR4	T<7/T>7	3,00	3,24	3,29	0,027	0,02	0,025
		T>7/A	0,42	0,39	0,34	0,005	0,001	0,000
		N>7/A	0,55	0,57	0,66	0,103	0,033	0,04
	CCL17	T>7/A	3,18	2,93	3,39	0,002	0,003	0,004
		N>7/A	2,98	3,12	2,79	0,002	0,005	0,01
	CCL22	T<7/A	2,35	2,46	2,58	0,037	0,045	0,051
	NOS2A	T>7/N=7	0,10	0,13	0,15	0,004	0,001	0,002
N=7/N>7		7,42	6,42	4,44	0,052 ^{&}	0,027	0,045	
ІАГ	IL1R1	T>7/A	0,39	0,41	0,37	0,059	0,027	0,006
		T>7/N=7	0,26	0,23	0,27	0,015	0,018	0,032
	CTLA4	T<7/A	4,10	4,80	4,50	0,012	0,002	0,002
		T<7/T>7	2,25	2,81	2,68	0,125	0,031	0,031
		T>7/N=7	0,32	0,44	0,40	0,042	0,065	0,065
		N=7/A	5,62	3,92	4,18	0,004	0,006	0,006
	IL2RA	T<7/A	2,18	2,44	1,89	0,02	0,003	0,008
T<7/T>7		0,20	0,12	0,09	0,075	0,006	0,061	

Додаток И.

Таблиця И.1.

Дані описової статистики ВЕ ЕМП генів-маркерів у групах аденокарцином (П), УНТ (Н) 1-2 (1-2ст) та 3-4 (3-4ст) стадії та аденом (А) ПЗ

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
KRT18	П (1-2 ст)	19,699	1,798	53,528	14,052	29,296	0,0014
	П (3-4 ст)	27,333	4,517	84,078	19,084	44,961	
	Н (1-2ст)	15,612	4,798	23,940	9,817	17,485	
	Н (3-4 ст)	18,203	5,534	46,191	10,064	34,570	
	А	12,631	0,692	31,273	6,102	17,625	
MMP9	П (1-2 ст)	1,020	0,072	6,867	0,215	2,677	0,0033
	П (3-4 ст)	0,833	0,028	27,489	0,399	2,466	
	Н (1-2ст)	0,565	0,061	2,257	0,170	1,351	
	Н (3-4 ст)	0,864	0,052	8,441	0,263	3,042	
	А	0,196	0,011	1,046	0,122	0,424	
VIM	П (1-2 ст)	11,254	3,929	22,227	6,375	14,506	0,0164
	П (3-4 ст)	13,299	4,126	24,109	8,521	16,545	
	Н (1-2ст)	8,965	0,909	20,286	5,072	10,537	
	Н (3-4 ст)	10,613	4,212	34,038	6,859	12,958	
	А	12,947	7,836	31,417	10,163	15,474	
PCAZ	П (1-2 ст)	0,510	0,012	56,165	0,074	10,750	0,0043
	П (3-4 ст)	0,793	0,007	40,224	0,073	22,755	
	Н (1-2ст)	0,775	0,021	14,769	0,159	1,970	
	Н (3-4 ст)	0,256	0,000	27,228	0,041	22,031	
	А	0,044	0,001	7,342	0,023	0,132	
HOTAIR	П (1-2 ст)	0,013	0,000	0,076	0,000	0,035	0,0014
	П (3-4 ст)	0,004	0,000	0,079	0,002	0,025	
	Н (1-2ст)	0,003	0,000	0,051	0,001	0,008	
	Н (3-4 ст)	0,003	0,000	0,057	0,001	0,011	
	А	0,000	0,000	0,015	0,0001	0,001	
SCHLAPI	П (1-2 ст)	0,018	0,000	2,274	0,005	0,029	0,008
	П (3-4 ст)	0,297	0,000	2,350	0,013	0,847	
	Н (1-2ст)	0,019	0,000	0,110	0,004	0,042	
	Н (3-4 ст)	0,038	0,000	1,148	0,014	0,350	
	А	0,005	0,000	0,117	0,001	0,017	

Примітка. * - Статистично значущі відмінності згідно тесту Краскела-

Уолліса з FDR=0,1

Додаток К.

Таблиця К.1.

Дані описової статистики ВЕ генів у групах П, Н з різними СГ та А ПЗ

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05 *
<i>AR</i> (1 isof)	П СГ<7	1,148	0,413	2,789	0,574	1,626	0,008
	П СГ=7	1,992	0,787	2,765	1,661	2,539	
	П СГ>7	1,323	0,440	3,353	0,911	2,228	
	Н СГ<7	1,357	0,447	6,834	0,783	1,430	
	Н СГ=7	1,961	1,145	3,227	1,354	2,629	
	Н СГ>7	1,720	0,537	4,153	0,967	2,098	
	А	2,129	0,879	4,936	1,623	2,672	
<i>CASP3</i>	П СГ<7	0,249	0,040	0,532	0,121	0,352	0,046
	П СГ=7	0,414	0,170	0,579	0,365	0,450	
	П СГ>7	0,290	0,074	0,869	0,148	0,394	
	Н СГ<7	0,265	0,075	0,647	0,166	0,310	
	Н СГ=7	0,399	0,294	0,572	0,334	0,486	
	Н СГ>7	0,234	0,058	0,685	0,149	0,320	
	А	0,303	0,152	1,088	0,207	0,587	
<i>CDH1</i>	П СГ<7	3,035	0,896	8,601	1,521	3,954	0,010
	П СГ=7	5,301	0,053	10,097	5,062	5,934	
	П СГ>7	2,815	0,161	7,247	1,462	3,764	
	Н СГ<7	3,707	1,858	5,466	2,864	4,531	
	Н СГ=7	4,942	2,562	5,705	3,519	5,118	
	Н СГ>7	2,931	0,888	8,253	1,935	4,724	
	А	2,752	0,004	8,941	2,001	3,661	
<i>KRT18</i>	П СГ<7	19,122	4,854	53,528	13,718	49,804	0,012
	П СГ=7	21,912	1,798	31,828	16,570	29,296	
	П СГ>7	23,485	4,517	84,078	17,656	39,360	
	Н СГ<7	15,571	4,798	46,191	8,058	19,663	
	Н СГ=7	15,652	8,424	23,940	10,366	17,847	
	Н СГ>7	16,505	5,534	42,552	10,064	23,924	
	А	12,631	0,692	31,273	6,102	17,625	
<i>MMP9</i>	П СГ<7	1,795	0,642	6,867	1,122	2,897	0,001
	П СГ=7	0,345	0,072	5,503	0,100	0,918	
	П СГ>7	0,810	0,028	27,489	0,313	2,466	
	Н СГ<7	0,855	0,067	3,042	0,319	1,891	
	Н СГ=7	0,389	0,061	2,257	0,243	0,946	
	Н СГ>7	0,674	0,052	8,441	0,170	2,168	
	А	0,196	0,011	1,046	0,122	0,424	
<i>OCLN</i>	П СГ<7	0,361	0,137	1,431	0,205	0,571	0,007
	П СГ=7	1,080	0,525	3,790	0,649	1,846	
	П СГ>7	0,565	0,059	3,491	0,318	1,157	
	Н СГ<7	0,411	0,248	0,893	0,310	0,478	
	Н СГ=7	0,636	0,512	1,376	0,537	0,949	
	Н СГ>7	0,565	0,117	2,484	0,391	1,061	
	А	0,396	0,227	1,574	0,332	0,593	

Продовж. табл. К.1.

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05 *
<i>XIAP</i>	П СГ<7	0,299	0,078	0,570	0,191	0,400	0,019
	П СГ=7	0,479	0,330	0,995	0,349	0,623	
	П СГ>7	0,332	0,088	0,633	0,164	0,407	
	Н СГ<7	0,261	0,060	0,925	0,191	0,392	
	Н СГ=7	0,522	0,251	0,677	0,420	0,597	
	Н СГ>7	0,287	0,044	0,568	0,160	0,459	
	А	0,301	0,182	0,896	0,235	0,386	
<i>PCAZ</i>	П СГ<7	0,647	0,017	22,755	0,046	9,739	0,006
	П СГ=7	8,480	0,012	56,165	0,355	26,476	
	П СГ>7	0,374	0,007	52,746	0,081	19,972	
	Н СГ<7	0,240	0,021	24,781	0,049	0,369	
	Н СГ=7	1,574	0,088	14,769	1,182	3,060	
	Н СГ>7	0,289	0,000	27,228	0,041	1,649	
	А	0,044	0,001	7,342	0,023	0,132	
<i>HOTAIR</i>	П СГ<7	0,017	0,003	0,056	0,007	0,043	0,004
	П СГ=7	0,008	0,000	0,047	0,002	0,030	
	П СГ>7	0,013	0,002	0,079	0,004	0,048	
	Н СГ<7	0,003	0,0004	0,027	0,001	0,004	
	Н СГ=7	0,003	0,0003	0,051	0,001	0,018	
	Н СГ>7	0,008	0,0004	0,057	0,003	0,011	
	А	0,001	0,0002	0,015	0,000	0,003	
<i>SCHLAPI</i>	П СГ<7	0,020	0,002	2,350	0,010	0,037	0,052
	П СГ=7	0,018	0,001	1,120	0,013	0,242	
	П СГ>7	0,270	0,000	1,651	0,018	0,452	
	Н СГ<7	0,042	0,004	0,989	0,022	0,079	
	Н СГ=7	0,017	0,0003	0,110	0,014	0,024	
	Н СГ>7	0,038	0,002	1,148	0,013	0,204	
	А	0,008	0,0003	0,117	0,002	0,040	

Примітка. * - Статистично значущі відмінності згідно тесту Краскела-

Уолліса з FDR=0,15.

Додаток Л.

Таблиця Л.1.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ ЕМП-пов'язаних генів у аденокарциномах ПЗ

Гени	CDH1	CDH2	AR 1 isof	AR 2 isof	FNI	VIM	OCLN	MMP2	MMP9	NKX3-1
CDH1	1,000									
CDH2	0,027	1,000								
AR (1 isof)	0,439	0,272	1,000							
AR (2 isof)	0,374	0,155	0,665	1,000						
FNI	-0,271	0,447	0,069	0,099	1,000					
VIM	-0,422	-0,033	-0,235	-0,444	0,214	1,000				
OCLN	0,585	0,057	0,609	0,523	-0,077	-0,243	1,000			
MMP2	-0,429	0,226	-0,053	-0,185	0,298	0,450	-0,377	1,000		
MMP9	-0,178	-0,095	-0,278	-0,175	-0,001	0,371	-0,205	0,354	1,000	
NKX3-1	0,817	0,167	0,540	0,538	-0,199	-0,514	0,603	-0,453	-0,304	1,000
PCA3	0,483	-0,429	0,151	0,380	-0,224	-0,299	0,512	-0,651	-0,269	0,389
PSA	0,528	-0,363	0,346	0,304	-0,560	-0,316	0,479	-0,446	-0,354	0,483
KRT18	0,402	-0,529	-0,064	0,103	-0,724	-0,238	0,363	-0,447	0,017	0,338
MKI67	0,227	0,110	0,356	0,430	-0,127	-0,275	0,467	0,013	-0,016	0,468
CASP3	0,250	0,568	0,492	0,389	0,485	-0,166	0,443	0,012	-0,330	0,444
XIAP	0,381	0,408	0,572	0,524	0,238	-0,283	0,654	-0,197	-0,308	0,575
PTEN	0,015	0,317	0,232	0,012	0,263	0,287	-0,004	0,497	0,231	0,024
HOTAIR	-0,420	0,552	-0,131	0,062	0,561	0,090	-0,428	0,206	0,122	-0,253
SCHLAP1	-0,025	-0,263	-0,007	0,127	-0,223	-0,012	0,356	-0,099	-0,192	-0,019

Гени	PCA3	PSA	KRT18	MKI67	CASP3	XIAP	PTEN	HOTAIR
PSA	0,660	1,000						
KRT18	0,522	0,694	1,000					
MKI67	0,092	0,285	0,201	1,000				
CASP3	-0,037	-0,067	-0,338	0,320	1,000			
XIAP	0,214	0,030	-0,151	0,392	0,754	1,000		
PTEN	-0,428	-0,352	-0,272	-0,183	0,118	0,114	1,000	
HOTAIR	-0,310	-0,532	-0,652	-0,171	-0,003	-0,031	0,029	1,000
SCHLAP1	0,376	0,575	0,613	0,186	-0,016	-0,071	-0,334	-0,422

Примітки: 1. **$p < 0,0001$** - синій жирний; 2. **$p < 0,01$** - червоний жирний курсив; 3. **$p < 0,05$** - червоний курсив з FDR=0,2

Додаток М.

Таблиця М.1.

Дані описової статистики ВЕ генів у групах П, Н з урахуванням стадій та аденом (А) передміхурової залози.

Ген/транс-крипт	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	р-рівні*
<i>ESR1</i>	П 1-2 ст	0,388	0,066	1,708	0,237	0,714	<0,0001
	П 3-4 ст	0,228	0,042	2,620	0,107	0,322	
	Н 1-2 ст	0,181	0,039	1,380	0,094	0,454	
	Н 3-4 ст	0,154	0,038	1,100	0,095	0,430	
	А	0,064	0,015	0,367	0,049	0,110	
<i>ESR2</i>	П 1-2 ст	0,028	0,005	0,091	0,013	0,047	
	П 3-4 ст	0,037	0,019	0,064	0,024	0,055	
	Н 1-2 ст	0,026	0,009	0,069	0,017	0,039	
	Н 3-4 ст	0,022	0,017	0,080	0,018	0,032	
	А	0,019	0,001	0,077	0,010	0,035	
<i>GCR AG</i>	П 1-2 ст	2,517	0,975	5,252	2,085	3,299	
	П 3-4 ст	3,747	1,485	4,622	2,386	4,181	
	Н 1-2 ст	2,613	0,887	5,125	2,070	3,201	
	Н 3-4 ст	3,822	1,475	5,996	2,324	3,960	
	А	2,652	1,768	6,378	2,394	3,282	
<i>GCR ins AG</i>	П 1-2 ст	2,509	0,950	8,842	1,502	3,166	0,0050
	П 3-4 ст	5,017	1,078	14,659	3,139	5,684	
	Н 1-2 ст	2,303	0,663	7,577	1,746	3,328	
	Н 3-4 ст	4,003	1,784	15,708	3,143	5,148	
	А	1,795	0,773	5,720	1,401	2,215	
<i>GCR ins B</i>	П 1-2 ст	0,646	0,209	38,792	0,398	5,733	
	П 3-4 ст	0,803	0,233	2,482	0,621	0,952	
	Н 1-2 ст	0,681	0,155	38,995	0,366	5,199	
	Н 3-4 ст	0,663	0,286	3,026	0,495	1,106	
	А	0,405	0,171	1,049	0,298	0,523	
<i>INSRA</i>	П 1-2 ст	0,369	0,084	1,498	0,265	0,461	0,0066
	П 3-4 ст	0,146	0,056	1,115	0,120	0,223	
	Н 1-2 ст	0,349	0,094	1,172	0,206	0,468	
	Н 3-4 ст	0,221	0,093	0,644	0,212	0,339	
	А	0,233	0,085	1,657	0,177	0,311	
<i>INSRB</i>	П 1-2 ст	0,297	0,129	1,285	0,231	0,573	
	П 3-4 ст	0,273	0,109	1,404	0,146	0,336	
	Н 1-2 ст	0,284	0,109	0,830	0,174	0,432	
	Н 3-4 ст	0,213	0,097	0,822	0,147	0,297	
	А	0,286	0,035	1,997	0,239	0,383	

Продовж. табл. М.1.

Ген/транскрипт	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні*
<i>IGF1R</i>	П 1-2 ст	3,572	0,617	9,137	2,292	4,139	0,0053
	П 3-4 ст	1,127	0,422	5,838	1,096	1,779	
	Н 1-2 ст	3,534	1,152	8,430	2,311	4,460	
	Н 3-4 ст	1,470	0,476	4,145	0,608	2,094	
	A	2,408	0,510	5,759	1,571	3,649	
<i>IGF1R tr</i>	П 1-2 ст	3,239	0,594	10,219	2,575	4,250	0,0035
	П 3-4 ст	0,991	0,478	5,922	0,753	1,952	
	Н 1-2 ст	2,702	1,266	13,585	2,210	4,081	
	Н 3-4 ст	1,534	0,545	3,787	0,604	1,830	
	A	2,649	0,487	7,795	1,629	3,532	
<i>PRLR</i>	П 1-2 ст	0,111	0,024	0,216	0,070	0,135	0,0078
	П 3-4 ст	0,050	0,006	0,284	0,024	0,086	
	Н 1-2 ст	0,102	0,036	0,341	0,075	0,146	
	Н 3-4 ст	0,096	0,004	0,415	0,037	0,161	
	A	0,207	0,001	1,149	0,092	0,317	
<i>PRL</i>	П 1-2 ст	0,000	0,000	0,007	0,000	0,001	
	П 3-4 ст	0,001	0,000	0,019	0,000	0,008	
	Н 1-2 ст	0,000	0,000	0,008	0,000	0,001	
	Н 3-4 ст	0,001	0,000	0,041	0,000	0,002	
	A	0,000	0,000	0,050	0,000	0,001	
<i>VDR</i>	П 1-2 ст	0,156	0,046	0,669	0,128	0,246	0,0132
	П 3-4 ст	0,092	0,058	0,254	0,087	0,108	
	Н 1-2 ст	0,149	0,029	0,317	0,096	0,242	
	Н 3-4 ст	0,141	0,056	0,244	0,089	0,151	
	A	0,087	0,022	0,312	0,061	0,144	
<i>SRD5A1</i>	П 1-2 ст	0,066	0,000	0,332	0,053	0,089	
	П 3-4 ст	0,076	0,028	0,101	0,055	0,087	
	Н 1-2 ст	0,074	0,000	0,125	0,050	0,093	
	Н 3-4 ст	0,098	0,041	0,136	0,069	0,121	
	A	0,063	0,025	0,483	0,048	0,095	
<i>SRD5A2</i>	П 1-2 ст	0,645	0,000	1,227	0,418	0,807	0,0001
	П 3-4 ст	0,233	0,059	1,733	0,139	0,332	
	Н 1-2 ст	0,670	0,000	1,504	0,537	1,013	
	Н 3-4 ст	0,315	0,038	1,235	0,218	0,397	
	A	0,995	0,220	3,643	0,719	1,677	

Примітка. * - Статистично значущі відмінності BE за тестом Краскелла-Уолліса з FDR=0,1.

Додаток Н.

Таблиця Н.1.

Дані описової статистики ВЕ генів у групах аденокарцином (П), УНТ (Н) з урахуванням СГ та аденом (А) передміхурової залози.

Ген/транс-крипт	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	р-рівні*
<i>ESR1</i>	П СГ<7	0,398	0,089	1,708	0,244	0,881	<0,0001
	П СГ=7	0,512	0,127	1,050	0,246	0,584	
	П СГ>7	0,228	0,042	2,620	0,107	0,466	
	Н СГ<7	0,104	0,040	1,380	0,045	0,250	
	Н СГ=7	0,356	0,124	1,180	0,189	0,637	
	Н СГ>7	0,173	0,038	1,100	0,095	0,439	
	А	0,064	0,015	0,367	0,049	0,110	
<i>ESR2</i>	П СГ<7	0,042	0,007	0,091	0,028	0,063	
	П СГ=7	0,032	0,005	0,072	0,014	0,056	
	П СГ>7	0,024	0,006	0,064	0,015	0,030	
	Н СГ<7	0,025	0,009	0,066	0,017	0,040	
	Н СГ=7	0,038	0,014	0,069	0,022	0,056	
	Н СГ>7	0,022	0,010	0,080	0,018	0,032	
	А	0,019	0,001	0,077	0,010	0,035	
<i>GCR AG</i>	П СГ<7	2,321	1,485	4,252	2,179	3,554	
	П СГ=7	2,690	1,792	5,252	2,226	3,492	
	П СГ>7	2,875	0,975	14,497	1,898	3,974	
	Н СГ<7	2,578	1,819	5,125	1,938	3,183	
	Н СГ=7	2,967	2,192	3,780	2,648	3,219	
	Н СГ>7	2,324	0,887	12,960	1,677	3,891	
	А	2,652	1,768	6,378	2,394	3,282	
<i>GCR ins AG</i>	П СГ<7	2,503	1,078	5,236	1,289	2,971	
	П СГ=7	2,966	1,364	8,842	2,001	5,100	
	П СГ>7	2,993	0,950	14,659	1,561	5,017	
	Н СГ<7	1,842	1,498	4,365	1,781	2,845	
	Н СГ=7	2,723	2,251	7,142	2,430	3,455	
	Н СГ>7	3,143	0,663	35,708	1,539	4,335	
	А	1,795	0,773	5,720	1,401	2,215	
<i>GCR ins B</i>	П СГ<7	0,468	0,233	17,576	0,286	0,877	0,0012
	П СГ=7	2,054	0,524	38,792	0,841	9,894	
	П СГ>7	0,796	0,209	17,672	0,325	0,952	
	Н СГ<7	0,409	0,245	17,329	0,364	0,783	
	Н СГ=7	1,875	0,393	38,995	0,851	21,376	
	Н СГ>7	0,663	0,155	11,798	0,318	1,141	
	А	0,405	0,171	1,049	0,298	0,523	

Продовж. табл. Н.1.

Ген/транс-крипт	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні*
<i>INSRA</i>	П СГ<7	0,389	0,084	0,693	0,184	0,441	
	П СГ=7	0,373	0,148	1,498	0,296	0,553	
	П СГ>7	0,243	0,056	1,115	0,157	0,348	
	Н СГ<7	0,239	0,163	0,782	0,202	0,364	
	Н СГ=7	0,423	0,195	1,172	0,348	0,583	
	Н СГ>7	0,242	0,093	0,644	0,174	0,391	
	А	0,233	0,085	1,657	0,177	0,311	
<i>INSRB</i>	П СГ<7	0,369	0,126	0,846	0,181	0,622	0,0459
	П СГ=7	0,399	0,248	1,285	0,297	0,584	
	П СГ>7	0,237	0,109	1,404	0,201	0,309	
	Н СГ<7	0,258	0,109	0,535	0,159	0,449	
	Н СГ=7	0,385	0,114	0,830	0,262	0,497	
	Н СГ>7	0,211	0,097	0,822	0,150	0,306	
	А	0,286	0,035	1,997	0,239	0,383	
<i>IGF1R</i>	П СГ<7	2,253	1,127	4,199	1,800	3,834	
	П СГ=7	4,185	2,331	9,137	3,836	4,752	
	П СГ>7	2,841	0,422	5,838	1,125	3,659	
	Н СГ<7	2,503	1,470	4,448	2,282	4,042	
	Н СГ=7	3,583	1,499	8,430	2,654	4,590	
	Н СГ>7	2,094	0,476	5,456	1,233	4,145	
	А	2,408	0,510	5,759	1,571	3,649	
<i>IGF1R tr</i>	П СГ<7	2,574	0,753	4,128	1,814	3,214	
	П СГ=7	4,648	2,644	10,219	3,265	4,964	
	П СГ>7	3,157	0,478	5,922	0,991	3,582	
	Н СГ<7	2,366	1,534	4,302	2,138	3,991	
	Н СГ=7	3,347	1,590	13,585	2,666	3,766	
	Н СГ>7	2,141	0,545	8,572	1,312	3,787	
	А	2,649	0,487	7,795	1,629	3,532	
<i>PRLR</i>	П СГ<7	0,079	0,006	0,164	0,068	0,115	0,0224
	П СГ=7	0,111	0,024	0,216	0,103	0,153	
	П СГ>7	0,086	0,008	0,284	0,052	0,136	
	Н СГ<7	0,066	0,004	0,316	0,062	0,138	
	Н СГ=7	0,130	0,082	0,341	0,087	0,178	
	Н СГ>7	0,099	0,027	0,415	0,073	0,149	
	А	0,207	0,001	1,149	0,092	0,317	

Продовж. табл. Н.1.

Ген/транс-крипт	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	р-рівні*
<i>PRL</i>	П СГ<7	0,001	0,000	0,007	0,000	0,002	
	П СГ=7	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	
	П СГ>7	0,000	0,000	0,019	0,000	0,002	
	Н СГ<7	0,000	0,000	0,009	0,000	0,002	
	Н СГ=7	0,000	0,000	0,002	0,000	0,001	
	Н СГ>7	0,000	0,000	0,041	0,000	0,001	
	A	0,000	0,000	0,050	0,000	0,001	
<i>VDR</i>	П СГ<7	0,203	0,062	0,669	0,126	0,278	0,0167
	П СГ=7	0,160	0,066	0,276	0,138	0,161	
	П СГ>7	0,113	0,046	0,295	0,092	0,139	
	Н СГ<7	0,139	0,052	0,250	0,068	0,198	
	Н СГ=7	0,256	0,057	0,721	0,145	0,311	
	Н СГ>7	0,141	0,029	0,317	0,086	0,155	
	A	0,087	0,022	0,312	0,061	0,144	
<i>SRD5A1</i>	П СГ<7	0,065	0,000	0,115	0,044	0,084	
	П СГ=7	0,068	0,030	0,142	0,062	0,126	
	П СГ>7	0,072	0,027	0,332	0,055	0,087	
	Н СГ<7	0,069	0,000	0,105	0,061	0,087	
	Н СГ=7	0,084	0,027	0,116	0,057	0,101	
	Н СГ>7	0,079	0,035	0,136	0,049	0,104	
	A	0,063	0,025	0,483	0,048	0,095	
<i>SRD5A2</i>	П СГ<7	0,740	0,000	1,012	0,397	0,820	0,0006
	П СГ=7	0,738	0,112	1,082	0,563	0,827	
	П СГ>7	0,278	0,059	1,733	0,167	0,477	
	Н СГ<7	0,661	0,000	1,475	0,494	1,361	
	Н СГ=7	0,678	0,564	1,438	0,650	0,987	
	Н СГ>7	0,415	0,038	1,504	0,262	0,800	
	A	0,995	0,220	3,643	0,719	1,677	

Примітка. * - Статистично значущі відмінності ВЕ за тестом Краскела-Уолліса з FDR=0,1

Додаток П.

Таблиця П.1.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів, асоційованих з раком ПЗ та ЕМП- пов'язаних генів у аденокарциномах ПЗ

Ген	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>GCR AG</i>	<i>GCR ins AG</i>	<i>GCR ins B</i>	<i>INSRA</i>	<i>INSR B</i>	<i>IGFIR</i>	<i>IGFIR tr</i>	<i>PRLR</i>	<i>PRL</i>	<i>VDR</i>	<i>SRD5A1</i>
<i>ESR2</i>	0,252	1											
<i>GCR AG</i>	0,461	0,297	1										
<i>GCR ins AG</i>	0,267	0,457	0,855	1									
<i>GCR ins B</i>	0,307	0,322	0,539	0,584	1								
<i>INSRA</i>	0,435	0,301	0,060	0,060	0,217	1							
<i>INSRB</i>	0,445	0,418	0,340	0,388	0,258	0,589	1						
<i>IGFIR</i>	0,382	0,119	0,071	0,023	0,303	0,751	0,486	1					
<i>IGFIR tr</i>	0,324	0,043	0,008	-0,051	0,230	0,755	0,450	0,936	1				
<i>PRLR</i>	0,322	-0,079	0,087	-0,130	0,162	0,462	0,315	0,446	0,458	1			
<i>PRL</i>	-0,293	0,093	-0,053	-0,051	-0,260	-0,391	-0,050	-0,371	-0,325	-0,038	1		
<i>VDR</i>	0,340	0,241	0,063	0,025	0,247	0,536	0,278	0,248	0,237	0,232	-0,250	1	
<i>SRD5A1</i>	-0,091	0,134	-0,029	0,125	-0,163	0,256	0,079	0,249	0,304	-0,227	-0,136	-0,035	1
<i>SRD5A2</i>	0,328	0,505	-0,038	-0,023	0,080	0,424	0,491	0,422	0,398	0,329	-0,029	0,406	0,091

Ген	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>GCR AG</i>	<i>GCR ins AG</i>	<i>GCR ins B</i>	<i>INSRA</i>	<i>INSR B</i>	<i>IGFIR</i>	<i>IGFIR tr</i>	<i>PRLR</i>	<i>PRL</i>	<i>VDR</i>	<i>SRD5A1</i>	<i>SRD5A2</i>
<i>AR 1 isof</i>	0,383	-0,049	0,017	-0,071	0,204	0,518	0,217	0,532	0,560	0,464	-0,263	0,291	-0,033	0,319
<i>AR 1 isof</i>	0,291	-0,096	0,043	-0,025	0,322	0,405	0,202	0,488	0,461	0,443	-0,401	0,280	-0,041	0,058
<i>CDH1</i>	0,124	0,116	-0,136	-0,153	0,311	0,601	0,296	0,716	0,631	0,367	-0,335	0,304	0,118	0,429
<i>CDH2</i>	0,118	0,125	0,518	0,530	0,289	0,120	0,311	-0,007	-0,064	0,253	0,156	0,049	-0,138	0,116
<i>CASP3</i>	0,130	0,104	0,261	0,314	0,340	0,332	0,348	0,248	0,239	0,220	-0,161	0,172	0,174	0,118
<i>FNI</i>	0,343	0,168	0,499	0,520	0,362	0,039	0,364	-0,104	-0,140	0,001	-0,057	0,070	-0,229	-0,049
<i>KRT18</i>	-0,313	-0,263	-0,512	-0,527	-0,328	0,063	-0,381	0,220	0,221	-0,051	-0,153	-0,055	0,258	-0,174
<i>OCN</i>	0,150	-0,177	-0,190	-0,246	0,044	0,634	0,079	0,619	0,619	0,276	-0,268	0,326	0,267	-0,009
<i>MKI67</i>	-0,094	-0,128	-0,248	-0,161	-0,085	0,315	-0,090	0,140	0,186	0,087	-0,129	0,408	0,174	0,032
<i>MMP2</i>	0,149	0,365	0,313	0,374	-0,124	-0,072	0,089	-0,350	-0,305	-0,331	0,056	0,137	0,205	0,205
<i>MMP9</i>	0,462	0,355	0,213	0,099	-0,201	0,136	0,109	0,000	0,014	-0,078	0,014	0,208	0,162	0,211
<i>NKX3.1</i>	0,071	-0,038	-0,104	-0,105	0,366	0,562	0,212	0,632	0,592	0,495	-0,293	0,351	0,064	0,307
<i>PSA</i>	-0,330	-0,434	-0,658	-0,717	-0,307	0,168	-0,305	0,299	0,356	0,202	-0,215	-0,087	0,160	0,037
<i>VIM</i>	0,209	0,034	0,268	0,203	-0,316	-0,101	0,226	-0,201	-0,125	-0,164	0,244	-0,116	0,296	0,027
<i>XIAP</i>	0,235	0,101	0,177	0,191	0,427	0,562	0,349	0,416	0,439	0,389	-0,178	0,355	0,064	0,084
<i>PCA3</i>	-0,092	-0,315	-0,341	-0,388	0,042	0,193	-0,111	0,408	0,402	0,095	-0,304	-0,124	0,054	-0,257
<i>HOTAIR</i>	0,133	0,006	0,549	0,469	0,293	-0,053	0,203	-0,136	-0,163	0,300	0,260	0,019	-0,509	-0,157
<i>SCHLAP1</i>	-0,421	-0,536	-0,477	-0,545	-0,440	-0,169	-0,587	-0,118	-0,098	-0,148	-0,057	-0,258	0,148	-0,445

Примітки: 1. $p < 0.0001$ - синій жирний; 2. $p < 0.001$ - синій жирний курсив;

3. $p < 0.01$ - червоний жирний; 4. $p < 0.05$ - червоний

Додаток Р.

Таблиця Р.1.

Описова статистика ВЕ у групах П, Н з різними стадіями та А ПЗ зі значущістю за тестом Краскела-Уолліса (*) та Дана-Бонферроні (**)

Ген	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні*
<i>FASN</i>	П 1-2 ст	3,345	0,801	34,230	1,913	8,967	0,0161
	П 3-4 ст	2,228	0,351	9,091	0,761	3,560	
	Н 1-2 ст	3,040	1,169	13,687	2,340	4,476	
	Н 3-4 ст	2,293	0,068	5,461	0,761	4,511	
	А	2,252	0,191	4,567	1,241	2,485	
<i>CPT1C</i>	П 1-2 ст	0,136	0,028	0,435	0,084	0,227	
	П 3-4 ст	0,174	0,073	0,303	0,143	0,208	
	Н 1-2 ст	0,140	0,042	0,754	0,112	0,218	
	Н 3-4 ст	0,221	0,054	0,381	0,157	0,295	
	А	0,161	0,096	0,714	0,133	0,217	
<i>LDLR</i>	П 1-2 ст	0,726	0,190	4,890	0,610	1,501	0,0027
	П 3-4 ст	0,386	0,052	0,732	0,174	0,526	
	Н 1-2 ст	0,729	0,227	3,300	0,486	1,533	
	Н 3-4 ст	0,412	0,042	1,616	0,258	0,589	
	А	0,605	0,223	1,415	0,360	0,835	
<i>HMGCR</i>	П 1-2 ст	0,422	0,165	9,724	0,268	1,002	0,0141
	П 3-4 ст	0,137	0,043	0,712	0,077	0,573	
	Н 1-2 ст	0,533	0,000	2,037	0,355	0,844	
	Н 3-4 ст	0,288	0,030	0,911	0,128	0,511	
	А	0,631	0,331	1,717	0,469	0,901	
<i>COX2</i>	П 1-2 ст	1,554	0,399	10,554	0,869	2,679	0,0232
	П 3-4 ст	1,533	0,291	5,667	0,472	2,023	
	Н 1-2 ст	1,704	0,308	14,623	0,774	3,028	
	Н 3-4 ст	1,077	0,425	9,087	0,488	2,688	
	А	0,542	0,152	4,647	0,256	1,053	

Ген	Пари груп з відмінностями ВЕ	p-рівні**
<i>FASN</i>	П 1-2 ст/А	0,0372
<i>LDLR</i>	П 1-2 ст/П 3-4 ст	0,0156
	П 3-4ст/Н 1-2 ст	0,0194
<i>HMGCR</i>	П 3-4 ст/А	0,0211
<i>COX2</i>	П 1-2 ст/А	0,0385
	Н 1-2 ст/А	0,0245

Додаток С.

Таблиця С.1.

Описова статистика ВЕ у групах П, Н з різним СГ та А ПЗ зі значущістю за тестом Краскела-Уолліса (*) та Дана-Бонферроні (**)

Ген	Група	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p-рівні*
<i>FASN</i>	П СГ<7	1,744	0,801	26,882	1,261	3,132	0,0163
	П СГ=7	4,395	1,101	34,230	3,559	17,312	
	П СГ>7	3,390	0,351	28,300	2,228	8,048	
	Н СГ<7	2,455	1,169	4,015	2,132	2,882	
	Н СГ=7	3,452	1,845	13,687	2,750	4,546	
	Н СГ>7	3,905	0,068	13,264	1,481	5,039	
	А	2,252	0,191	4,567	1,241	2,485	
<i>CPT1C</i>	П СГ<7	0,141	0,058	0,435	0,080	0,257	
	П СГ=7	0,113	0,080	0,293	0,098	0,188	
	П СГ>7	0,165	0,028	0,313	0,138	0,208	
	Н СГ<7	0,127	0,054	0,444	0,096	0,165	
	Н СГ=7	0,245	0,068	0,754	0,133	0,266	
	Н СГ>7	0,177	0,042	0,381	0,138	0,225	
	А	0,161	0,096	0,714	0,133	0,217	
<i>LDLR</i>	П СГ<7	0,741	0,193	2,735	0,295	1,227	
	П СГ=7	1,359	0,191	4,890	0,711	1,879	
	П СГ>7	0,554	0,052	2,316	0,386	0,668	
	Н СГ<7	0,702	0,258	3,300	0,386	2,045	
	Н СГ=7	1,094	0,353	2,512	0,509	1,407	
	Н СГ>7	0,530	0,042	2,693	0,412	1,097	
	А	0,605	0,223	1,415	0,360	0,835	
<i>HMGCR</i>	П СГ<7	0,385	0,077	9,724	0,179	0,536	0,0148
	П СГ=7	0,773	0,275	1,570	0,403	1,434	
	П СГ>7	0,330	0,043	1,268	0,206	0,688	
	Н СГ<7	0,441	0,128	1,283	0,278	0,755	
	Н СГ=7	0,665	0,214	2,037	0,578	0,982	
	Н СГ>7	0,393	0,000	1,400	0,172	0,711	
	А	0,631	0,331	1,717	0,469	0,901	
<i>COX2</i>	П СГ<7	1,880	0,429	6,348	0,864	2,717	0,0035
	П СГ=7	2,640	1,144	10,554	1,550	4,638	
	П СГ>7	0,874	0,291	5,667	0,497	1,558	
	Н СГ<7	1,601	0,377	14,623	0,517	3,713	
	Н СГ=7	2,005	0,845	4,610	1,736	2,166	
	Н СГ>7	1,497	0,308	9,087	0,520	2,085	
	А	0,542	0,152	4,647	0,256	1,053	

Ген	Пари груп з відмінностями ВЕ	p-рівні **
<i>FASN</i>	П СГ=7/А	0,0491
<i>COX2</i>	П СГ=7/А	0,0124
	Н СГ=7/А	0,0462

Додаток Т.

Таблиця Т.1.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів ліпідного метаболізму, простато-специфічних, ЕМП-пов'язаних генів та маркерів стромальних елементів у аденокарциномах ПЗ

№	Гени	FASN	CPT1C	LDLR	HMGCR	COX2	№	Гени	FASN	CPT1C	LDLR	HMGCR	COX2
1	CDH1	0,682	-0,174	0,643	0,637	0,073	33	THY1	-0,252	0,431	-0,107	0,042	0,127
2	CDH2	-0,215	0,578	-0,078	0,268	0,254	34	ACTA2	-0,590	0,503	-0,212	-0,078	0,470
3	AR 1 isof	0,324	0,329	0,306	0,521	0,217	35	CXCL12	-0,516	0,583	-0,390	-0,142	0,330
4	AR 2 isof	0,308	0,269	0,369	0,469	0,077	36	CXCL14	0,129	-0,087	-0,084	-0,062	-0,013
5	PRLR	0,257	0,111	0,412	0,618	0,050	37	CTGF	-0,237	0,074	0,103	0,086	0,531
6	PRL	-0,394	0,199	-0,295	-0,284	-0,010	38	HIF1A	0,276	-0,046	0,579	0,511	0,371
7	FNI	-0,333	0,388	-0,107	0,074	0,450	39	SI00A4	-0,506	0,467	-0,548	-0,460	-0,027
8	VIM	-0,346	0,166	-0,435	-0,529	0,117	40	FAP	-0,118	0,473	-0,207	0,040	0,194
9	OCLN	0,645	-0,082	0,434	0,486	-0,013	41	CD68	0,099	0,275	0,171	0,256	0,288
10	MMP2	-0,546	0,586	-0,562	-0,526	0,037	42	CD163	-0,407	0,277	-0,621	-0,534	-0,076
11	MMP9	-0,254	0,058	-0,372	-0,338	0,005	43	CCR4	-0,007	0,176	0,144	0,216	0,316
12	VDR	0,124	0,306	0,226	0,318	0,239	44	CCL17	-0,068	0,073	-0,409	-0,367	-0,282
13	NKX3-1	0,719	0,008	0,717	0,815	0,070	45	CCL22	0,042	0,231	0,092	0,141	0,112
14	PCA3	0,668	-0,595	0,500	0,370	-0,160	46	NOS2A	0,145	0,224	0,307	0,167	0,329
15	PSA	0,748	-0,472	0,431	0,238	-0,446	47	CIAS1	-0,018	0,281	0,283	0,360	0,633
16	HOTAIR	-0,374	0,430	-0,104	0,175	0,250	48	CTLA4	-0,008	-0,064	0,068	0,142	0,278
17	SCHLAPI	0,438	-0,359	-0,100	-0,243	-0,746	49	KLRK1	-0,121	0,145	-0,053	0,226	0,187
18	KRT18	0,694	-0,511	0,212	-0,008	-0,566	50	IRF1	0,157	0,129	0,455	0,446	0,433
19	MKI67	0,344	0,101	0,370	0,304	-0,043	51	IL1RL1	-0,208	0,302	0,252	0,238	0,364
20	CASP3	0,136	0,304	0,353	0,551	0,336	52	IL1R1	0,243	0,330	0,441	0,589	0,380
21	XIAP	0,323	0,237	0,460	0,706	0,346	53	IL2RA	-0,079	-0,052	-0,087	-0,093	-0,034
22	PTEN	-0,147	0,575	-0,215	-0,094	0,214	54	MSMB	0,080	-0,069	0,147	0,085	-0,006
23	GCRAG	-0,344	0,497	-0,173	0,085	0,366	55	HLA-G	-0,202	0,062	-0,603	-0,562	-0,245
24	GCRinsAG	-0,381	0,577	-0,155	0,005	0,423							
25	GCRinsB	0,096	0,255	0,376	0,496	0,477							
26	ESR1	-0,081	0,318	-0,017	0,207	0,438							
27	ESR2	-0,368	0,363	-0,022	-0,019	0,429							
28	INSRA	0,343	0,205	0,494	0,511	0,298							
29	INSRB	-0,174	0,361	0,249	0,376	0,687							
30	IGF1R	0,436	0,018	0,567	0,532	0,251							
31	SRD5A1	0,234	-0,068	0,099	-0,172	-0,090							
32	SRD5A2	-0,056	0,253	0,215	0,248	0,360							

Примітки: 1. $p < 0,05$ – червоні; 2. $p < 0,01$ – червоний жирний курсив; 3. $p < 0,001$ – червоний жирний

Додаток У.

Таблиця У.1.

Дані описової статистики ВЕ генів ПАФ у групах П, Н з різними стадіями та А передміхурової залози (* - за тестом Краскела-Уолліса з FDR=0,2)

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
<i>ACTA2</i>	П 1-2 ст	89,909	20,917	412,01	62,79	129,333	
	П 3-4 ст	96,673	35,072	281,768	76,795	156,101	
	Н 1-2ст	86,332	29,923	203,147	65,074	125,702	
	Н 3-4 ст	55,296	26,263	154,637	37,942	115,354	
	А	92,329	56,143	299,884	74,621	132,95	
<i>CTGF</i>	П 1-2 ст	10,691	5,431	65,433	8,107	16,302	0,0012
	П 3-4 ст	14,209	2,994	24,378	7,745	17,114	
	Н 1-2ст	8,358	2,699	29,541	6,176	15,361	
	Н 3-4 ст	5,196	2,628	14,929	3,964	6,724	
	А	4,583	1,803	28,079	3,287	10,298	
<i>CXCL12</i>	П 1-2 ст	0,124	0,029	0,334	0,082	0,166	0,0000
	П 3-4 ст	0,141	0,03	0,329	0,089	0,216	
	Н 1-2ст	0,13	0,025	0,527	0,102	0,213	
	Н 3-4 ст	0,112	0,036	0,315	0,086	0,163	
	А	0,312	0,11	0,651	0,249	0,417	
<i>CXCL14</i>	П 1-2 ст	2,304	0,199	22,365	1,14	5,517	0,0000
	П 3-4 ст	2,753	0,887	63,428	0,989	22,299	
	Н 1-2ст	0,865	0,141	3,715	0,573	1,762	
	Н 3-4 ст	2,188	0,111	49,347	1,123	3,796	
	А	0,394	0,143	4,779	0,293	0,485	
<i>HIF1A</i>	П 1-2 ст	1,965	0,977	5,145	1,531	2,675	0,0000
	П 3-4 ст	1,023	0,649	2,36	0,921	1,157	
	Н 1-2ст	1,866	0,005	3,662	1,446	2,206	
	Н 3-4 ст	0,92	0,598	1,991	0,786	1,041	
	А	2,068	0,965	4,799	1,645	2,947	
<i>FAP</i>	П 1-2 ст	0,176	0,013	0,575	0,11	0,238	
	П 3-4 ст	0,142	0,05	0,647	0,073	0,358	
	Н 1-2ст	0,109	0,012	0,402	0,054	0,212	
	Н 3-4 ст	0,091	0,039	0,408	0,067	0,182	
	А	0,091	0,019	1,279	0,039	0,132	
<i>S100A4</i>	П 1-2 ст	21,185	2,556	59,247	11,746	29,515	
	П 3-4 ст	50,537	8,466	258,211	11,063	94,751	
	Н 1-2ст	21,286	3,141	81,063	12,579	32,854	
	Н 3-4 ст	32,631	5,37	162,32	13,918	81,289	
	А	27,764	8,39	76,886	16,446	36,073	
<i>THY1</i>	П 1-2 ст	1,633	0,643	5,119	1,061	2,721	0,0701
	П 3-4 ст	1,469	0,535	5,83	1,351	1,83	
	Н 1-2ст	1,515	0,403	3,351	0,878	2,213	
	Н 3-4 ст	1,564	0,34	2,158	1,476	2,03	
	А	0,973	0,25	3,938	0,681	1,532	

Додаток Ф.

Таблиця Ф.1.

Дані описової статистики ВЕ генів ПАМ у групах П, Н з різними стадіями та А передміхурової залози (* - за тестом Краскела-Уолліса з FDR=0,2)

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
CD68	П 1-2 ст	2,205	0,885	18,661	1,486	4,37	
	П 3-4 ст	0,803	0,134	10,319	0,551	1,625	
	Н 1-2ст	2,358	0,669	8,172	1,641	3,704	
	Н 3-4 ст	1,651	0,169	6,998	0,539	3,124	
	А	2,731	0,708	22,498	1,471	4,231	
CD163	П 1-2 ст	2,478	0,725	14,614	1,515	4,938	0,0001
	П 3-4 ст	35,354	1,166	142,803	11,618	61,782	
	Н 1-2ст	1,985	0,689	9,936	1,248	3,617	
	Н 3-4 ст	27,173	1,037	93,815	16,979	64,857	
	А	2,019	0,771	23,007	1,156	4,488	
CCL17	П 1-2 ст	0,01	0,001	0,067	0,004	0,017	0,0000
	П 3-4 ст	0,054	0,006	0,236	0,009	0,116	
	Н 1-2ст	0,006	0,001	0,07	0,004	0,011	
	Н 3-4 ст	0,084	0,011	0,336	0,056	0,132	
	А	0,006	0,001	0,024	0,004	0,009	
CCL22	П 1-2 ст	0,2	0,01	0,642	0,117	0,292	0,0062
	П 3-4 ст	0,074	0,003	0,344	0,048	0,082	
	Н 1-2ст	0,158	0,013	0,462	0,104	0,21	
	Н 3-4 ст	0,163	0,002	0,57	0,097	0,246	
	А	0,086	0,002	0,335	0,056	0,134	
CCR4	П 1-2 ст	0,156	0,017	0,654	0,085	0,272	0,0006
	П 3-4 ст	0,079	0,002	0,142	0,016	0,111	
	Н 1-2ст	0,164	0,027	0,592	0,1	0,263	
	Н 3-4 ст	0,137	0,001	0,523	0,077	0,201	
	А	0,232	0,094	3,138	0,191	0,405	
NOS2A	П 1-2 ст	0,007	0	0,257	0,003	0,017	0,0055
	П 3-4 ст	0,002	0	0,007	0	0,006	
	Н 1-2ст	0,01	0,001	0,096	0,004	0,03	
	Н 3-4 ст	0,002	0,001	0,022	0,001	0,006	
	А	0,006	0	0,103	0,004	0,01	

Додаток Х.

Таблиця Х.1.

Описова статистика ВЕ ІАГ генів у групах П, Н з різними стадіями та А ПЗ за тестом Краскела-Уолліса з FDR=0,2 (*)

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
<i>CIAS1</i>	П 1-2 ст	0,153	0,051	0,47	0,124	0,202	
	П 3-4 ст	0,127	0,034	0,363	0,087	0,238	
	Н 1-2ст	0,182	0,046	0,603	0,094	0,271	
	Н 3-4 ст	0,139	0,074	0,427	0,118	0,196	
	А	0,127	0,052	0,593	0,089	0,221	
<i>CTLA4</i>	П 1-2 ст	0,087	0,007	0,425	0,052	0,184	0,0158
	П 3-4 ст	0,07	0,028	0,239	0,06	0,117	
	Н 1-2ст	0,097	0,026	0,365	0,067	0,165	
	Н 3-4 ст	0,12	0,051	0,349	0,061	0,142	
	А	0,039	0,006	0,219	0,03	0,071	
<i>HLA-G</i>	П 1-2 ст	137,874	25,081	244,89	88,761	188,734	
	П 3-4 ст	162,055	97,866	448,585	125,594	245,191	
	Н 1-2ст	119,608	31,088	356,051	70,546	184,076	
	Н 3-4 ст	141,729	79,736	497,198	119,216	390,41	
	А	104,086	53,32	230,095	78,528	147,66	
<i>IL1R1</i>	П 1-2 ст	2,142	0,14	8,884	1,705	4,047	0,0010
	П 3-4 ст	1,01	0,456	6,783	0,845	1,375	
	Н 1-2ст	2,639	0,958	8,55	2,129	5,261	
	Н 3-4 ст	1,397	0,294	8,454	0,501	2,004	
	А	3,733	0,708	8,572	2,88	4,871	
<i>IL1RL1</i>	П 1-2 ст	0,132	0,05	0,494	0,09	0,2	
	П 3-4 ст	0,163	0,026	0,37	0,065	0,255	
	Н 1-2ст	0,15	0,07	0,842	0,12	0,226	
	Н 3-4 ст	0,21	0,009	0,335	0,171	0,289	
	А	0,211	0,058	0,701	0,156	0,294	
<i>IL2RA</i>	П 1-2 ст	0,107	0,019	0,533	0,08	0,134	
	П 3-4 ст	0,08	0,02	0,156	0,055	0,137	
	Н 1-2ст	0,092	0,026	0,237	0,072	0,127	
	Н 3-4 ст	0,076	0,035	0,201	0,059	0,125	
	А	0,072	0,025	0,451	0,036	0,102	
<i>IRF1</i>	П 1-2 ст	1,121	0,386	153,203	0,778	1,648	
	П 3-4 ст	0,767	0,688	2,926	0,736	0,813	
	Н 1-2ст	0,947	0,325	3,361	0,686	1,414	
	Н 3-4 ст	1,055	0,576	2,59	0,835	1,895	
	А	0,94	0,486	5,527	0,696	1,073	
<i>KLRK1</i>	П 1-2 ст	0,004	0	0,027	0,002	0,006	
	П 3-4 ст	0,002	0	0,053	0	0,008	
	Н 1-2ст	0,004	0	0,04	0,001	0,009	
	Н 3-4 ст	0,006	0	0,022	0,003	0,008	
	А	0,008	0	0,032	0,005	0,016	
<i>MSMB</i>	П 1-2 ст	384,275	3,563	1858,97	176,88	715,69	0,0243
	П 3-4 ст	102,783	3,661	4887,53	56,79	240,35	
	Н 1-2ст	564,827	19,582	3196,3	307,6	1121,02	
	Н 3-4 ст	75,143	9,688	4813,28	18,51	181,68	
	А	670,962	1,793	4367,28	178,17	1933,82	

Додаток Ц.

Таблиця Ц.1.

Дані описової статистики ВЕ ПАФ генів зі змінами у групах П, Н з різними СГ та А ПЗ за тестом Краскела-Уолліса (*) з FDR=0,2

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
ACTA2	П СГ<7	105,703	38,931	216,963	83,626	126,342	
	П СГ=7	102,295	35,665	412,010	66,942	130,044	
	П СГ>7	88,268	20,917	281,768	36,597	156,101	
	Н СГ<7	78,544	36,827	160,480	39,212	112,399	
	Н СГ=7	86,723	29,923	203,147	75,433	153,936	
	Н СГ>7	75,093	26,263	154,637	53,219	115,354	
	А	92,329	56,143	299,884	74,621	132,950	
CXCL12	П СГ<7	0,148	0,030	0,334	0,062	0,178	0,0001
	П СГ=7	0,092	0,029	0,294	0,087	0,194	
	П СГ>7	0,134	0,038	0,329	0,089	0,144	
	Н СГ<7	0,176	0,036	0,507	0,104	0,237	
	Н СГ=7	0,109	0,025	0,527	0,082	0,224	
	Н СГ>7	0,115	0,050	0,315	0,086	0,179	
	А	0,312	0,110	0,651	0,249	0,417	
CXCL14	П СГ<7	1,477	0,333	5,309	0,625	2,379	<0,0001
	П СГ=7	2,474	0,199	22,365	2,179	7,293	
	П СГ>7	2,982	0,352	63,428	0,989	9,050	
	Н СГ<7	0,750	0,141	1,935	0,419	0,989	
	Н СГ=7	1,068	0,360	3,715	0,672	2,085	
	Н СГ>7	1,748	0,111	49,347	0,883	2,665	
	А	0,394	0,143	4,779	0,293	0,485	
CTGF	П СГ<7	14,358	2,994	41,444	7,370	18,722	0,0046
	П СГ=7	11,791	7,825	65,433	9,636	18,793	
	П СГ>7	9,066	4,497	24,378	7,745	14,209	
	Н СГ<7	7,776	2,628	28,104	4,155	15,488	
	Н СГ=7	15,234	2,854	29,541	7,506	18,016	
	Н СГ>7	6,724	3,097	14,929	5,196	9,685	
	А	4,583	1,803	28,079	3,287	10,298	
FAP	П СГ<7	0,208	0,061	0,496	0,077	0,450	
	П СГ=7	0,174	0,083	0,575	0,117	0,245	
	П СГ>7	0,145	0,013	0,647	0,119	0,236	
	Н СГ<7	0,067	0,026	0,313	0,044	0,147	
	Н СГ=7	0,134	0,029	0,402	0,110	0,227	
	Н СГ>7	0,101	0,012	0,408	0,075	0,198	
	А	0,091	0,019	1,279	0,039	0,132	
HIF1A	П СГ<7	1,962	0,921	5,145	1,596	2,284	0,0003
	П СГ=7	2,686	1,467	3,748	2,266	3,176	
	П СГ>7	1,254	0,649	2,798	1,023	1,745	
	Н СГ<7	1,747	0,000	2,163	1,369	1,923	
	Н СГ=7	2,250	0,872	3,662	1,593	2,843	
	Н СГ>7	1,287	0,598	2,411	0,935	1,898	
	А	2,068	0,965	4,799	1,645	2,947	
S100A4	П СГ<7	18,277	8,345	40,415	11,505	27,712	
	П СГ=7	13,087	2,556	59,247	9,485	37,547	
	П СГ>7	25,117	8,780	258,211	19,756	50,537	
	Н СГ<7	25,213	11,589	44,469	13,918	35,363	
	Н СГ=7	17,669	5,608	81,063	13,505	30,344	
	Н СГ>7	28,808	3,141	162,320	10,947	58,043	
	А	27,764	8,390	76,886	16,446	36,073	

Додаток Ш.

Таблиця Ш.1.

Дані описової статистики ВЕ ПАМ генів зі змінами у групах П, Н з різними СГ та А ПЗ за тестом Краскела-Уолліса (*) з FDR=0,2

Гени	Групи зразків	Медіана	Мінімум	Максимум	25-й перцентиль	75-й перцентиль	Гени
CD68	П СГ<7	3,574	0,401	18,661	1,138	5,812	
	П СГ=7	1,634	1,286	9,842	1,399	3,834	
	П СГ>7	1,776	0,134	10,319	0,968	2,659	
	Н СГ<7	2,077	0,854	7,326	1,216	3,907	
	Н СГ=7	3,615	0,945	8,172	2,046	5,098	
	Н СГ>7	1,897	0,169	6,998	0,910	2,877	
	А	2,731	0,708	22,498	1,471	4,231	
CD163	П СГ<7	2,810	0,957	14,614	1,702	9,352	
	П СГ=7	1,604	0,725	11,562	1,023	4,597	
	П СГ>7	3,784	1,166	142,803	2,207	35,354	
	Н СГ<7	2,042	0,783	31,845	1,031	6,159	
	Н СГ=7	2,685	1,166	9,936	1,929	3,837	
	Н СГ>7	3,371	0,689	93,815	1,330	21,871	
	А	2,019	0,771	23,007	1,156	4,488	
CCL17	П СГ<7	0,009	0,003	0,035	0,004	0,018	0,0005
	П СГ=7	0,006	0,001	0,052	0,003	0,012	
	П СГ>7	0,019	0,002	0,236	0,010	0,067	
	Н СГ<7	0,006	0,003	0,056	0,004	0,012	
	Н СГ=7	0,006	0,001	0,070	0,004	0,009	
	Н СГ>7	0,016	0,001	0,336	0,009	0,084	
	А	0,006	0,001	0,024	0,004	0,009	
CCL22	П СГ<7	0,223	0,079	0,642	0,123	0,335	
	П СГ=7	0,120	0,010	0,528	0,069	0,308	
	П СГ>7	0,087	0,003	0,391	0,057	0,231	
	Н СГ<7	0,152	0,054	0,462	0,075	0,305	
	Н СГ=7	0,187	0,066	0,455	0,148	0,214	
	Н СГ>7	0,155	0,002	0,570	0,108	0,180	
	А	0,086	0,021	0,335	0,056	0,134	
CCR4	П СГ<7	0,262	0,016	0,626	0,138	0,439	0,0003
	П СГ=7	0,126	0,017	0,654	0,091	0,172	
	П СГ>7	0,080	0,002	0,328	0,051	0,131	
	Н СГ<7	0,208	0,061	0,592	0,089	0,419	
	Н СГ=7	0,174	0,066	0,418	0,159	0,275	
	Н СГ>7	0,152	0,001	0,523	0,073	0,175	
	А	0,232	0,094	3,138	0,191	0,405	
NOS2A	П СГ<7	0,013	0,000	0,257	0,003	0,026	0,0059
	П СГ=7	0,008	0,000	0,041	0,006	0,022	
	П СГ>7	0,003	0,000	0,013	0,002	0,006	
	Н СГ<7	0,009	0,001	0,096	0,003	0,031	
	Н СГ=7	0,023	0,008	0,077	0,011	0,043	
	Н СГ>7	0,005	0,001	0,029	0,002	0,010	
	А	0,006	0,000	0,103	0,004	0,010	
THY1	П СГ<7	1,730	0,768	4,105	1,215	3,102	
	П СГ=7	1,491	0,745	5,119	1,094	2,058	
	П СГ>7	1,486	0,535	5,830	1,195	2,240	
	Н СГ<7	1,547	0,475	2,669	0,778	2,204	
	Н СГ=7	1,482	0,403	2,387	1,132	1,993	
	Н СГ>7	1,760	0,340	3,351	0,867	2,046	
	А	0,973	0,250	3,938	0,681	1,532	

Додаток Щ.

Таблиця Щ.1.

Дані описової статистики BE ІАГ генів зі значущими змінами у групах П, Н з різними СГ та А ПЗ за тестом Краскела-Уолліса (*) з FDR=0,2

Гени	Групи зразків	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
<i>CIAS1</i>	П СГ<7	0,172	0,140	0,288	
	П СГ=7	0,160	0,141	0,213	
	П СГ>7	0,127	0,090	0,173	
	Н СГ<7	0,186	0,088	0,284	
	Н СГ=7	0,258	0,169	0,303	
	Н СГ>7	0,134	0,100	0,190	
	А	0,128	0,090	0,221	
<i>CTLA4</i>	П СГ<7	0,174	0,084	0,329	0,0011
	П СГ=7	0,091	0,046	0,188	
	П СГ>7	0,065	0,050	0,094	
	Н СГ<7	0,124	0,039	0,168	
	Н СГ=7	0,162	0,101	0,194	
	Н СГ>7	0,086	0,061	0,120	
	А	0,039	0,030	0,071	
<i>HLA-G</i>	П СГ<7	187,276	100,768	223,505	
	П СГ=7	122,310	50,971	150,865	
	П СГ>7	134,901	110,631	201,285	
	Н СГ<7	116,345	65,678	216,992	
	Н СГ=7	122,872	71,790	174,874	
	Н СГ>7	139,578	82,147	208,436	
	А	104,086	78,528	147,661	
<i>IL1R1</i>	П СГ<7	1,986	1,350	3,331	0,0009
	П СГ=7	4,031	2,788	4,127	
	П СГ>7	1,375	1,058	1,921	
	Н СГ<7	2,531	1,188	3,272	
	Н СГ=7	5,087	2,466	6,156	
	Н СГ>7	2,004	1,086	3,308	
	А	3,734	2,880	4,871	

Продовж. табл. Ц.1.

Гени	Групи зразків	Медіана	25-й перцентиль	75-й перцентиль	p<0,05*
<i>IL1RL1</i>	П СГ<7	0,119	0,070	0,311	
	П СГ=7	0,170	0,156	0,369	
	П СГ>7	0,115	0,082	0,163	
	Н СГ<7	0,143	0,130	0,201	
	Н СГ=7	0,303	0,129	0,453	
	Н СГ>7	0,163	0,110	0,210	
	А	0,212	0,157	0,294	
<i>IL2RA</i>	П СГ<7	0,137	0,118	0,250	0,0235
	П СГ=7	0,091	0,066	0,106	
	П СГ>7	0,085	0,047	0,108	
	Н СГ<7	0,102	0,070	0,155	
	Н СГ=7	0,094	0,089	0,108	
	Н СГ>7	0,080	0,053	0,125	
	А	0,073	0,036	0,102	
<i>IRF1</i>	П СГ<7	1,256	0,817	2,384	
	П СГ=7	1,368	0,943	1,643	
	П СГ>7	0,791	0,699	1,028	
	Н СГ<7	0,747	0,633	1,941	
	Н СГ=7	1,233	1,162	1,439	
	Н СГ>7	0,982	0,760	1,080	
	А	0,941	0,697	1,073	
<i>KLRK1</i>	П СГ<7	0,005	0,002	0,016	
	П СГ=7	0,004	0,000	0,005	
	П СГ>7	0,004	0,000	0,006	
	Н СГ<7	0,004	0,003	0,009	
	Н СГ=7	0,001	0,000	0,004	
	Н СГ>7	0,005	0,002	0,008	
	А	0,008	0,005	0,016	
<i>MSMB</i>	П СГ<7	556,654	289,927	1125,945	
	П СГ=7	583,107	256,100	769,853	
	П СГ>7	144,881	64,539	331,449	
	Н СГ<7	612,322	274,245	1894,171	
	Н СГ=7	563,112	485,550	1213,500	
	Н СГ>7	125,822	60,470	605,796	
	А	670,962	178,170	1933,819	

Додаток Ю.

Таблиця Ю.1.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів-маркерів
ПАФ, ПАМ, ІАГ та ЕМП-пов'язаних генів у аденокарциномах ПЗ

Гени	AR 1 isof	AR 2 isof	CDH1	CDH2	CASP3	FNI	KRT18	MKI67	MMP2
ACTA2	-0,133	-0,138	-0,188	0,514	0,118	0,567	-0,717	-0,381	0,445
THY1	-0,021	-0,007	-0,143	0,391	0,197	0,524	-0,475	0,088	0,315
CXCL12	0,043	-0,158	-0,357	0,446	0,323	0,527	-0,657	-0,072	0,593
CXCL14	-0,072	0,081	0,047	0,182	0,043	0,268	0,020	-0,239	-0,082
CTGF	-0,168	-0,248	0,009	0,188	0,176	0,430	-0,395	-0,266	0,191
HIF1A	0,375	0,167	0,567	0,039	0,384	0,133	-0,127	0,400	-0,005
S100A4	-0,209	-0,264	-0,389	0,475	-0,094	0,192	-0,381	-0,156	0,652
FAP	0,240	0,100	-0,024	0,444	0,418	0,525	-0,421	0,156	0,511
CD68	0,273	0,223	0,185	0,183	0,261	0,133	-0,143	0,448	0,192
CD163	-0,428	-0,359	-0,394	0,114	-0,237	0,130	-0,111	-0,099	0,466
CCR4	0,218	0,119	0,192	-0,131	0,078	0,074	-0,096	0,318	0,277
CCL17	-0,353	-0,153	-0,279	-0,029	-0,197	0,059	0,108	0,205	0,308
CCL22	0,255	0,261	0,196	-0,063	0,070	-0,087	0,055	0,450	0,231
NOS2A	0,261	0,121	0,293	-0,057	0,242	0,079	-0,081	0,197	0,170
CIAS1	0,206	0,166	0,127	0,155	0,332	0,299	-0,192	0,328	-0,043
CTLA4	-0,062	-0,106	0,161	-0,242	0,083	-0,007	0,049	0,286	0,171
KLRK1	0,227	0,235	-0,104	-0,036	0,142	0,099	-0,221	0,160	0,047
IRF1	0,237	0,285	0,334	-0,080	0,327	0,184	-0,076	0,385	-0,045
IL1RL1	0,226	0,268	-0,116	0,277	0,505	0,266	-0,353	0,369	0,045
IL1R1	0,766	0,592	0,536	0,317	0,566	0,241	-0,185	0,348	-0,067
IL2RA	-0,033	-0,199	-0,084	-0,418	-0,063	-0,081	0,065	0,274	0,226
MSMB	0,243	0,172	0,311	-0,289	-0,242	-0,335	0,252	0,215	-0,057
HLA-G	-0,183	-0,304	-0,160	-0,188	-0,250	-0,177	0,191	-0,002	0,457

Продовж. табл. Ю.1.

Гени	MMP9	NKX3-1	OCLN	PSA	VIM	XIAP	PCSA3	HOTAIR	SCHLAPI
ACTA2	0,140	-0,262	-0,454	-0,674	0,321	-0,031	-0,443	0,474	-0,583
THY1	0,196	-0,024	-0,163	-0,498	0,091	0,089	-0,408	0,491	-0,238
CXCL12	0,225	-0,225	-0,273	-0,578	0,403	0,080	-0,676	0,306	-0,379
CXCL14	0,018	-0,131	0,133	-0,124	0,128	0,001	0,212	0,228	0,120
CTGF	0,038	-0,079	-0,237	-0,476	0,213	0,034	-0,223	0,249	-0,546
HIF1A	0,005	0,473	0,375	0,089	-0,097	0,460	0,133	-0,151	-0,380
SI00A4	0,190	-0,410	-0,371	-0,494	0,339	-0,252	-0,641	0,322	-0,180
FAP	0,363	0,000	0,126	-0,418	0,223	0,259	-0,425	0,245	-0,258
CD68	0,320	0,278	0,255	-0,105	0,147	0,378	-0,176	-0,037	-0,312
CD163	0,536	-0,448	-0,304	-0,536	0,363	-0,303	-0,411	0,232	-0,084
CCR4	0,352	0,214	0,188	-0,084	0,087	0,184	-0,108	-0,038	-0,272
CCL17	0,422	-0,231	-0,058	-0,209	0,156	-0,270	-0,148	0,239	0,230
CCL22	0,508	0,209	0,317	-0,066	0,051	0,189	-0,172	-0,123	-0,154
NOS2A	-0,014	0,236	0,320	-0,001	0,267	0,465	0,090	-0,167	-0,228
CIAS1	0,041	0,300	0,057	-0,265	0,046	0,338	-0,110	0,157	-0,475
CTLA4	0,569	0,124	0,062	-0,120	0,071	0,067	-0,053	-0,171	-0,174
KLRK1	0,310	0,010	0,187	-0,210	-0,154	0,346	0,009	0,173	-0,171
IRF1	0,202	0,401	0,320	-0,114	-0,251	0,393	0,121	0,017	-0,362
IL1RL1	-0,167	0,095	0,063	-0,261	0,010	0,387	-0,208	0,282	-0,345
IL1R1	-0,088	0,577	0,573	0,166	-0,158	0,643	0,157	0,106	-0,209
IL2RA	0,491	-0,028	0,029	-0,096	0,192	-0,113	-0,134	-0,188	0,027
MSMB	0,070	0,126	0,124	0,375	-0,077	-0,113	0,134	-0,273	0,032
HLA-G	0,622	-0,337	0,008	-0,066	0,437	-0,287	-0,173	-0,216	0,217

Примітки: 1. $p < 0,05$ – червоний; 2. $p < 0,01$ – червоний курсив; 3. $p < 0,001$ – червоний жирни

Додаток Я.

Таблиця Я.1.

Коефіцієнти рангової кореляції за Спірменом (r^s) між ВЕ генів-маркерів ПАФ, ПАМ, ІАГ та генів, асоційованих з раком ПЗ у аденокарциномах ПЗ

Гени	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>GCR AG isof</i>	<i>GCRins AG isof</i>	<i>GCRins B isof</i>	<i>INSRA</i>	<i>INSRB</i>
<i>ACTA2</i>	0,359	0,364	0,714	0,683	0,383	0,005	0,489
<i>THY1</i>	0,401	0,037	0,467	0,357	0,179	0,087	0,187
<i>CXCL12</i>	0,301	0,271	0,350	0,389	-0,045	0,060	0,445
<i>CXCL14</i>	0,219	-0,231	0,494	0,362	0,146	0,000	0,048
<i>CTGF</i>	0,271	0,325	0,548	0,488	0,371	-0,014	0,425
<i>HIF1A</i>	0,279	0,271	-0,030	-0,012	0,205	0,578	0,438
<i>S100A4</i>	-0,025	0,172	0,572	0,553	0,056	-0,303	-0,037
<i>FAP</i>	0,536	0,174	0,401	0,352	0,069	0,298	0,334
<i>CD68</i>	0,365	0,125	0,150	0,067	0,019	0,507	0,389
<i>CD163</i>	0,029	0,267	0,489	0,473	-0,005	-0,303	-0,132
<i>CCR4</i>	0,406	0,259	0,160	-0,006	0,024	0,447	0,374
<i>CCL17</i>	-0,060	-0,051	0,300	0,288	-0,029	-0,168	-0,246
<i>CCL22</i>	0,424	0,216	0,082	-0,035	-0,088	0,600	0,304
<i>NOS2A</i>	0,294	0,284	0,086	0,105	0,198	0,578	0,430
<i>CIAS1</i>	0,305	0,269	0,224	0,297	0,240	0,375	0,524
<i>CTLA4</i>	0,280	0,405	0,011	0,010	-0,046	0,355	0,280
<i>KLRK1</i>	0,411	0,200	0,101	-0,036	0,106	0,150	0,067
<i>IRF1</i>	0,324	0,411	0,078	0,244	0,409	0,589	0,394
<i>IL1RL1</i>	-0,122	0,281	0,216	0,342	0,255	0,121	0,222
<i>IL1R1</i>	0,492	0,228	0,056	0,041	0,320	0,715	0,460
<i>IL2RA</i>	0,210	0,149	-0,113	-0,197	-0,258	0,180	-0,027
<i>MSMB</i>	0,012	0,107	-0,309	-0,336	-0,281	0,258	0,091
<i>HLA-G</i>	0,105	0,191	-0,050	-0,074	-0,500	-0,022	-0,053

Продовж. табл. Я.1.

Гени	<i>IGF1R</i>	<i>IGF1R tr</i>	<i>VDR</i>	<i>PRLR</i>	<i>PRL</i>	<i>SRD5A1</i>	<i>SRD5A2</i>
<i>ACTA2</i>	0,016	-0,060	-0,043	-0,018	0,059	-0,194	0,199
<i>THY1</i>	-0,137	-0,219	0,192	0,155	-0,051	-0,258	0,055
<i>CXCL12</i>	-0,163	-0,135	0,034	0,013	0,196	0,081	0,337
<i>CXCL14</i>	0,163	0,053	-0,306	-0,161	-0,207	0,183	-0,323
<i>CTGF</i>	0,002	-0,080	-0,056	-0,062	0,010	0,030	0,129
<i>HIF1A</i>	0,500	0,503	0,436	0,283	-0,221	0,165	0,585
<i>SI00A4</i>	-0,323	-0,345	-0,209	-0,269	0,261	0,031	-0,012
<i>FAP</i>	-0,017	-0,052	0,398	0,078	-0,211	0,096	0,243
<i>CD68</i>	0,226	0,306	0,662	0,267	-0,128	0,194	0,405
<i>CD163</i>	-0,340	-0,345	-0,096	-0,365	0,337	0,153	-0,112
<i>CCR4</i>	0,298	0,333	0,652	0,127	-0,174	0,025	0,428
<i>CCL17</i>	-0,280	-0,234	-0,027	-0,325	-0,014	0,151	-0,338
<i>CCL22</i>	0,303	0,363	0,701	0,251	-0,234	0,179	0,292
<i>NOS2A</i>	0,331	0,385	0,584	0,060	-0,073	0,195	0,235
<i>CIAS1</i>	0,256	0,278	0,377	0,123	0,043	0,075	0,294
<i>CTLA4</i>	0,153	0,215	0,349	-0,080	-0,166	0,266	0,401
<i>KLRK1</i>	0,015	0,013	0,370	0,153	0,082	-0,111	0,080
<i>IRF1</i>	0,432	0,442	0,630	0,074	-0,406	0,231	0,317
<i>IL1RL1</i>	0,082	0,134	0,222	0,102	0,217	0,163	0,069
<i>IL1R1</i>	0,641	0,631	0,481	0,517	-0,215	-0,011	0,460
<i>IL2RA</i>	-0,026	0,052	0,435	-0,097	-0,119	0,059	0,112
<i>MSMB</i>	0,312	0,373	0,113	0,243	-0,035	-0,099	0,398
<i>HLA-G</i>	-0,087	-0,028	-0,032	-0,348	0,153	0,174	0,061

Примітки: 1. $p < 0,05$ – червоний; 2. $p < 0,01$ – червоний курсив; 3. $p < 0,001$ – червоний жирний