

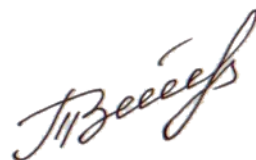
**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ
І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р. Є. КАВЕЦЬКОГО**

ЗАДВОРНИЙ ТАРАС ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 616.65 - 006: 577. 22.017

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ОЗНАКИ, АСОЦІЙОВАНІ ЗІ СТУПЕНЕМ
ЗЛОЯКІСНОСТІ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ**

14.01.07 – онкологія



АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук, старший дослідник
Лук'янова Наталія Юрївна,
завідувачка лабораторії механізмів медикаментозної
резистентності Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН
України.

Офіційні опоненти:

- доктор біологічних наук, професор
Кашуба Володимир Іванович,
завідувач відділу молекулярної онкогенетики Інституту
молекулярної біології і генетики НАН України;
- кандидат медичних наук,
старший науковий співробітник
Лялькін Сергій Анатолійович,
старший науковий співробітник науково-дослідного
відділення хіміотерапії солідних пухлин Національного
інституту раку МОЗ України.

Захист відбудеться 28 грудня 2020 р. о 13 год. 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий « » листопада 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Л. М. Шлапацька

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Згідно з останніми даними статистики, рак передміхурової залози (РПЗ) займає провідні позиції за показниками захворюваності та смертності в структурі онкологічних захворювань як в Україні, так і в світі (Rawla P., 2019; Bray F. et al., 2018; Бюлетень національного канцер-реєстру України, 2018-2019; Стаховский Э.А. и др., 2016). Накопичений клінічний досвід дозволяє зробити висновок про гетерогенність РПЗ як за морфологічною будовою і молекулярним профілем, так і за клінічним перебігом, що вимагає різних підходів до діагностики та терапії. В одних випадках захворювання перебігає латентно і не впливає на якість та тривалість життя хворих, в інших – виявляється на пізніх клінічних стадіях, коли лікування є дороговартісним і що головне – малоефективним (Kashuba V.I. et al., 2018, 2019; Нюшко К.М., 2018; Yadav S.S. et al., 2018).

Попри досягнутий за останні десятиліття прогрес у терапії РПЗ, залишається високою частота розвитку рецидиву захворювання, особливо протягом перших 3-х років після хірургічного втручання. Ще однією вагомою проблемою в цьому аспекті є те, що рецидив РПЗ після простатектомії виникає безсимптомно.

Для визначення стратегії лікування в кожному конкретному випадку необхідним є прогнозування агресивності перебігу РПЗ. Згідно з даними літератури, застосування в рутинній практиці лише клінічних показників (рівень простатичного специфічного антигена (ПСА), стадія пухлини за системою TNM і сума балів за шкалою гістологічної класифікації Глісона (індекс Глісона)) може призводити до хибної оцінки ступеня злості захворювання приблизно в половині випадків, що ускладнює вибір адекватної терапії (Bernal-Soriano M.C. et al., 2019; Shtivelman E. et al., 2014). Оцінка агресивності новоутворень може допомогти відокремити пацієнтів, яким показано активне спостереження, від тих, яким потрібне радикальне лікування, а також дозволяє з'ясувати особливості перебігу захворювання та його можливості до прогресування (Saini S., 2016; Щербина О.В., 2007). З огляду на це, пошук факторів, які б дозволили спрогнозувати агресивний потенціал з урахуванням біологічних особливостей пухлинних клітин, є пріоритетним напрямком досліджень.

Відомо, що виникнення і прогресія злостіх новоутворень характеризуються порушенням системи мікроРНК-залежного посттранскрипційного контролю генів, залучених у підтримання клітинного гомеостазу (Tan W. et al., 2018; Chekhun V.F. et al., 2017; Lukianova N.Y. et al., 2016). МікроРНК регулюють велику кількість біологічних процесів, найважливішими з яких є проліферація, апоптоз і клітинний цикл (Lukianova N.Y. et al., 2020; Chekhun V.F. et al., 2019, 2017; O'Brien J. et al., 2018;). Встановлено, що під час розвитку РПЗ відбувається зміна профілю експресії мікроРНК, проте відомості щодо їх специфічності та значення в прогресії пухлинної хвороби є достатньо суперечливими та потребують подальшого вивчення (Hoeu C. et al., 2019; Cozar J.M. et al., 2019; Лук'янова Н.Ю. та ін., 2019).

Останні дослідження свідчать про можливу роль лактоферину (ЛФ) у

розвитку РПЗ. ЛФ є білком із набором біологічних властивостей різного характеру: він регулює концентрацію іонів заліза у крові і секретах, бере участь у захисних реакціях організму, в тому числі проявляє виражені протипухлинні властивості (Wang B. et al., 2019; Chekhun V.F. et al., 2018; Roseanu A. et al., 2006). Відомо, що у хворих на РПЗ рівень цього глікопротеїну знижується як у пухлинній тканині, так і в плазмі крові, при тому, що передміхурова залоза є одним із найбільших ЛФ-продукуючих органів у осіб чоловічої статі (Porter C.M. et al., 2019; Ieni A. et al., 2013; Sande M. et al., 1981). Проте не з'ясованим залишається питання щодо прогностичного значення ЛФ у хворих на РПЗ.

Згідно з даними сучасної літератури (Chekhun V.F. et al., 2017; Harris K.S. et al., 2017; Ni J. et al., 2014), значна роль у формуванні ступеня злоякісності новоутворень різного гістогенезу належить пухлинним стовбуровим клітинам (ПСК), наявність яких пов'язують з процесами метастазування, виникнення рецидивів, а також резистентністю до протипухлинної терапії. Незважаючи на численні дослідження, до сьогодні не сформовано єдиного погляду на ключові маркери фенотипу ПСК, а також остаточно не визначено роль цих клітин у розвитку та прогресії РПЗ, їх зв'язок із гормональним статусом хворих та особливостями мікрооточення новоутворень (Li S. et al., 2020; Leão R. et al., 2017).

Таким чином, розширення молекулярно-генетичних досліджень на експериментальному та клінічному матеріалі з урахуванням показників мікроРНК, ЛФ, а також маркерів ПСК у тканині РПЗ дозволить розкрити додаткові механізми формування міжпухлинної гетерогенності цієї нозологічної форми раку. Одержані результати щодо особливостей експресії молекулярно-біологічних маркерів *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі забезпечать об'єктивну оцінку агресивності РПЗ, що стане підґрунтям для предиктивного прогнозу перебігу хвороби та розробки нових програм персоналізованої терапії хворих.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертація виконана у лабораторії механізмів медикаментозної резистентності відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України відповідно до плану науково-дослідних робіт за такими темами: «Молекулярна епідеміологія металомісних білків у взаємовідносинах пухлини та організму» (2012-2016 рр.; № державної реєстрації 0112U002197), «Роль лактоферину в ініціації та перебігу найбільш розповсюджених гормонзалежних злоякісних новоутворень» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0115U005381), «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонзалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034), «Роль епітеліально-мезенхімального переходу у механізмах формування медикаментозної резистентності клітин раку передміхурової залози людини» (2017-2018 рр., № державної реєстрації 0117U006124).

Мета дослідження. Виявлення молекулярно-біологічних та епігенетичних біомаркерів раку передміхурової залози людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу.

Завдання дослідження:

1. Вивчити та охарактеризувати фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ різного ступеня злоякісності.
2. Проаналізувати зв'язок експресії ЛФ і маркерів ПСК зі ступенем злоякісності клітин РПЗ людини ліній DU-145 та LNCaP.
3. Вивчити особливості експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності.
4. Дослідити топологію та кількісні показники експресії ЛФ і маркерів ПСК в тканині хворих на РПЗ.
5. Проаналізувати зв'язок експресії ЛФ і маркерів ПСК з клініко-патологічними особливостями РПЗ та показниками безрецидивної виживаності хворих.
6. З'ясувати особливості експресії пухлинних та циркулюючих мікроРНК -205 та -214, оцінити їх клінічне значення в якості маркерів перебігу РПЗ.
7. Розробити панель молекулярних та епігенетичних маркерів для прогнозування агресивності перебігу РПЗ.

Об'єкт дослідження: клітинні лінії та клінічний матеріал хворих на РПЗ.

Предмет дослідження: статус молекулярно-біологічних (ЛФ, CD24, CD44, мРНК NANOG) та епігенетичних (мікроРНК -21, -199a, -205, -214, -200b, -320, -let7) маркерів РПЗ та їх зв'язок з агресивністю пухлинного процесу.

Методи дослідження. Експресію рецепторів стероїдних гормонів (андрогенів (AR), естрогену- α (ER α), - β (ER β) та прогестерону (PR)), рецептора епідермального фактора росту (Her2/neu), молекул міжклітинної адгезії (E- та N-кадгеринів) маркерів ПСК (CD24, CD44) та ЛФ у клітинах ліній РПЗ людини визначали імуноцитохімічним методом, а на парафінових зрізах операційного матеріалу хворих на РПЗ – імуногістохімічним методом. Експресію мікроРНК та мРНК NANOG в клітинах ліній РПЗ людини та пухлинній тканині хворих на РПЗ визначали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Достовірність відмінностей між показниками двох незалежних груп за кількісною ознакою оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента або U-критерію Манн-Уїтні. Для оцінки зв'язку експресії досліджених маркерів із клініко-патологічними характеристиками РПЗ проводили з використанням коефіцієнту Спірмена. Виживаність хворих аналізували за методом Каплана-Мейера, достовірність між кривими – з використанням логарифмічного рангового тесту. Достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

Наукова новизна одержаних результатів. На підставі комплексного дослідження в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі вперше в Україні ідентифіковано молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані зі ступенем злоякісності РПЗ.

Експериментальними дослідженнями в системі *in vitro* доповнено дані щодо гетерогенності експресії ЛФ та маркерів ПСК в клітинах РПЗ. Встановлено, що характерною ознакою клітин РПЗ високого ступеня злоякісності лінії DU-145 є

наявність клітин з експресією маркерів ПСК та низький рівень експресії ЛФ ($87,0 \pm 8,0$ балів, $p < 0,05$), порівняно з клітинами низького ступеня злоякісності лінії LNCaP з відсутністю клітин, позитивних за маркерами ПСК та середнім рівнем ЛФ ($120,0 \pm 7,5$ балів відповідно).

Вперше в системі *in vitro* ідентифіковано профіль експресії мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності. Встановлено, що у клітинах РПЗ людини високого ступеня злоякісності лінії DU-145 спостерігається підвищення рівня експресії онкогенних мікроРНК -21, -199a, -205 та -214 (у 1,3; 2,4; 1,3 та 1,5 рази, відповідно) та зниження у 1,6 раза рівня онкосупресорної мікроРНК-320 порівняно з клітинами РПЗ низького ступеня злоякісності лінії LNCaP.

На клінічному матеріалі доведено зв'язок експресії ЛФ та маркерів ПСК із ступенем злоякісності РПЗ. Найвищий рівень експресії ЛФ зафіксовано у пухлинних клітинах хворих на II стадію РПЗ з відсутністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та низьким рівнем ПСА у сироватці крові ($p < 0,05$).

Вперше встановлено, що наявність клітин із фенотипом ПСК ($CD44^+CD24^{-low}$ та мРНК NANOG) у пухлинній тканині прямо корелює з такими показниками злоякісності РПЗ як категорія Т за TNM, індекс Глісона та показник ПСА у сироватці крові хворих. Доведено, що рівень експресії мРНК NANOG у пухлинній тканині прямо корелює з регіонарним метастазуванням РПЗ ($r = 0,75$; $p < 0,05$).

Доведена можливість використання показників експресії ЛФ та маркерів ПСК у пухлинній тканині в якості прогностичного фактора виживаності хворих на РПЗ: безрецидивна 2-річна виживаність хворих на РПЗ є значно меншою за наявності експресії маркерів ПСК ($p < 0,05$) та відсутності експресії ЛФ ($p < 0,05$).

Вперше встановлено, що високий ступінь злоякісності РПЗ асоціюється зі збільшенням рівня експресії мікроРНК, що беруть участь у регуляції експресії ЛФ та маркерів ПСК. Про це свідчить достовірний кореляційний зв'язок між рівнем експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 зі стадією РПЗ ($\rho = 0,63$; $\rho = 0,55$ та $\rho = 0,47$; $\rho = 0,52$), наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів ($\rho = 0,50$; $\rho = 0,63$ та $\rho = 0,42$; $\rho = 0,56$), індекс Глісона ($\rho = 0,39$; $\rho = 0,45$ та $\rho = 0,44$; $\rho = 0,39$) та рівнем ПСА у сироватці крові хворих ($\rho = 0,48$; $\rho = 0,52$ та $\rho = 0,57$; $\rho = 0,37$).

Практичне значення роботи. На підставі комплексних експериментальних та клінічних досліджень обґрунтовано можливість використання показників експресії ЛФ, мікроРНК-205, мікроРНК-214 та маркерів ПСК для прогнозування агресивності перебігу РПЗ.

Розроблено спосіб прогнозування перебігу РПЗ шляхом імуногістохімічного дослідження показників експресії ПСК ($CD44^+CD24^{-low}$) у пухлинних клітинах операційного матеріалу, що дає можливість здійснювати високоточний прогноз ризику виникнення рецидиву. Це забезпечує можливість корекції схем лікування, а, отже, дозволяє покращити результати лікування та підвищити виживаність хворих.

Розроблено спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на РПЗ

шляхом імуногістохімічного дослідження рівня експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих на РПЗ, що в комплексі з індексом Глісона дозволяє виявляти хворих з високою ймовірністю розвитку рецидиву у перший рік після проведення хірургічного лікування та сприяє підвищенню якості прогнозування перебігу РПЗ і підбору тактики лікування на засадах індивідуалізованої терапії.

Теоретично-експериментальні результати дисертаційної роботи впроваджені в клінічну практику згідно з інформаційним листом «Спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на рак передміхурової залози» (Інформац. лист / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Т.В. Задворний // Київ. – МОЗ України. – 2018. - № 2018-353).

Результати проведеного дослідження можуть бути впроваджені у практичну роботу онкоурологічних відділень та патоморфологічних лабораторій онкологічних закладів України, у лекціях лікарям на курсах підвищення кваліфікації з онкоурології, студентам біологічних факультетів та медичних університетів.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є закінченим дослідженням, виконаним безпосередньо автором. Спільно з науковим керівником сформовано мету і завдання, розроблено дизайн та план дослідження, узагальнено отримані результати та сформульовано висновки дисертаційної роботи. Автором здійснено інформаційний пошук та аналіз сучасної літератури за тематикою роботи. Здобувачем особисто виконано експериментальну частину роботи, зокрема дослідження в системі *in vitro* та *ex vivo*, визначення молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу. Автором проведено аналіз, теоретичне узагальнення і статистичну обробку одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені у вигляді усних і стендових доповідей на численних вітчизняних конференціях: «Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин» (Яремче, 2015), «Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології», (Київ, 2016), «XIII з'їзд онкологів та радіологів України» (Київ, 2016), «Інтегральні клініко-патогенетичні підходи в діагностиці і терапії раку» (Київ, 2016), Scientific Conference "Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy" (Kyiv, 2017), «Онкологія сьогодні: від діагностики до лікування» (Київ, 2017), XVI міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances» (Київ, 2018), 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, 2019), «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances» (Київ, 2019), «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 2019), «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку» (Київ, 2019), та закордонних: «IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии» (Минск, 2016), 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference (Strbske Pleso, 2016); 13th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference "Molecular Determinants of T-Cell Immunity" (Štrbské Pleso, 2018), 5th European Congress of Immunology - ECI 2018 (Amsterdam, 2018), 1 літній школі 10th

EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (Yerevan, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 29 наукових робіт, з яких 1 глава монографії, 7 статей, 5 з яких у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України (у тому числі 2 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), 1 патент України на корисну модель, 1 інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я та 19 тез у збірках наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація обсягом 185 сторінок складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, розділу «Узагальнення та обговорення результатів дослідження», висновків, списку використаних джерел літератури, який налічує 255 посилань (у тому числі 75 кирилицею та 180 латиницею). Дисертація містить 35 рисунків і 27 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. В основу дисертації покладено результати комплексних експериментальних і клінічних (ретроспективних і проспективних) досліджень.

Експериментальні дослідження проводили на 2 лініях клітин РПЗ людини (LNCaP та DU-145), одержаних із колекції банку тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Клінічні дослідження. У дисертаційне дослідження були включені результати клінічного обстеження і лікування 233 чоловіків, які знаходились на стаціонарному лікуванні у Національному інституті раку МОЗ України, ДУ «Інститут урології НАМН України» та Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2014-2017 рр., і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Оцінку значення експресії мікроРНК для прогнозування агресивності перебігу РПЗ здійснено в зразках сироватки крові та пухлинної тканини 113 хворих на РПЗ II-IV стадій (проспективна група). Дослідження топології та кількісних показників експресії ЛФ і маркерів ПСК для з'ясування їх клінічного значення в якості маркерів перебігу пухлинного процесу проведено на зразках тканини РПЗ 120 хворих II-IV стадій (ретроспективна група). Загальна клініко-патологічна характеристика хворих обох груп представлена у табл. 1.

Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародною класифікацією пухлин TNM 7 (2009 р.) та 8 видання (2016 р.).

Всім хворим на РПЗ проведені клінічні, лабораторні та інструментальні дослідження відповідно до стандартів діагностики та лікування хворих на РПЗ, затверджених Наказом МОЗ України № 235 від 02.04.2014 р. Клінічний діагноз встановлювали на підставі визначення рівня ПСА в сироватці крові і пальцевого ректального дослідження, результатів комп'ютерної чи магнітно-резонансної томографії, остеосцинтиграфії. Діагноз РПЗ було верифіковано шляхом

дослідження гістологічних препаратів після проведення трансректальної мультифокальної біопсії передміхурової залози під ультразвуковим контролем.

Таблиця 1

Клініко-патологічна характеристика хворих на РПЗ

Показник	Ретроспективна група		Проспективна група	
	Кількість хворих		Кількість хворих	
	n	%	n	%
Загальна кількість хворих	120	100	113	100
Вік хворих (роки)				
Середній	59,0±3,4		63,0±5,8	
Коливання віку	51 – 81		45 – 80	
Стадія РПЗ				
Стадія II	70	58,3	37	32,7
Стадія III	32	26,6	34	30,0
Стадія IV	18	15,1	42	37,3
Категорія T за TNM				
T2	73	60,8	37	32,7
T3	36	30,0	74	65,5
T4	11	9,2	2	1,8
Категорія N за TNM				
N1	15	12,5	42	37,2
N0	105	87,5	71	62,8
Сума балів за Глісоном				
<7 балів	35	29,2	45	39,8
≥7 балів	85	70,8	68	60,2
Рівень ПСА				
<10 нг/мл	43	35,8	38	33,6
>10 нг/мл	77	64,2	75	66,4
Біохімічний рецидив				
Встановлено	37	30,8	-	-
Не виявлено	83	69,2	-	-

Після оперативного втручання хворі ретроспективної групи проходили обстеження протягом 2 років для виявлення можливого розвитку біохімічного рецидиву, який визначали при підвищенні рівня ПСА >0,2 нг/мл впродовж двох послідовних обстежень.

Як видно з наведених даних (табл. 1), хворі обох груп були одного віку. У більшості пацієнтів переважали пухлини з високим індексом Глісона. Біохімічний рецидив захворювання був встановлений у 30,8 % хворих ретроспективної групи.

Морфологічні методи. Для вивчення гістологічної структури пухлин використовували парафінові блоки операційного матеріалу, з яких готували

гістологічні зрізи товщиною 4-5 мікронів. Клінічний діагноз за Міжнародною класифікацією пухлин передміхурової залози (2004 р. та 2016 р.), ступінь диференціювання та індекс Глісона встановлювали після перегляду зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозином.

Імуноцитохімічні методи. У системі *in vitro* у клітинах РПЗ людини експресію білкових маркерів досліджували за допомогою імуноцитохімічного методу. Імуногістохімічне дослідження ЛФ, CD44 та CD24 у клітинах РПЗ проводили на парафінових зрізах (4-5 мікронів) біопсійного та операційного матеріалу. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла, які є специфічними до AR (клон 441), ER α (клон 1D5), ER β (клон 14C8), PR (PgR636), Her2/neu (клон c-erbB-2), E-кадгерину (клон NCH-38), N-кадгерину (клон CD235), CD44 (клон SP37), CD24 (SN3b), ЛФ (клон JE49-60), Ki-67 (клон MIB-1). Для детекції реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (Thermo Scientific, USA). Оцінку експресії досліджуваних білків у клітинах культур і пухлин проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин за методом H-Score (McClelland R.A. et al., 1991). Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів – низький, від 101 до 200 балів – середній, від 201 до 300 балів — високий рівень експресії.

Дослідження експресії маркерів ПСК проводили на клінічному матеріалі шляхом імуногістохімічного одночасного дослідження експресії CD24 та CD44 у пухлинних клітинах РПЗ з використанням системи детекції MultiVision Polymer Detection System: anti-Mouse-HRP and anti-Rabbit-AP (Thermo Scientific, USA). В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла, специфічні до CD24 (clone SN3b; Thermo Scientific, USA) та CD44 (clone SP37; Máster Diagnóstica, Spain) у розведеннях відповідно до інструкції виробника. Пухлину вважали позитивною за фенотипом ПСК за умови наявності $\geq 10\%$ клітин з експресією CD44⁺CD24^{-low}.

Вивчення *інвазивного потенціалу* клітин проводили за допомогою Transwellassay, з використанням синтетичної мембрани для інвазії (BDBioCoat™ Matrigel™ InvasionChamber, Bedford, MA).

Молекулярно-біологічні методи. Експресію мікроРНК (- let7, -21, -126, -199a, -200b, -205, -214, -320a) досліджували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі з використанням TaqManMicroRNA Assay з праймерами на приладі Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR System.

Для виділення загальної РНК із культур клітин використовували комерційний набір "NucleoZOL" (MachereyNagel, Germany), а з парафінових блоків біопсійного та операційного матеріалу – "RNeasy FFPE Kit" (QIAGEN, Germany). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі "NanoDrop 2000c Spectrophotometer" (ThermoScientific, USA). кДНК синтезували з використанням набору для зворотної транскрипції TaqMan. Отриману внаслідок зворотної транскриптазної реакції кДНК використовували в кількісній ПЛР, яку проводили в трьох повторах за допомогою MaximaSYBRGreen/ROXqPCRMaterMix (ThermoScientific, USA) у 96-лункових планшетах (AppliedBiosystems, USA). В

якості ендogenous контролю для нормалізації показників експресії мікроРНК в клітинах ліній РПЗ людини використовували мікроРНК U6 (RNU6-1), а в пухлинній тканині та сироватці хворих на РПЗ – мікроРНК RNU48. Визначення експресії мРНК NANOG в клітинах ліній РПЗ людини та пухлинній тканині хворих проводили з використанням стандартного набору для реверс-транскрипції "РЕВЕРТА-L" (АмпліСенс, РФ). В якості ендogenous контролю використовувалась мРНК β -актину. Послідовності праймерів для ПЛР в реальному часі були визначені за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/> та синтезовані компанією Metabion (Germany). Відносну експресію мікроРНК обраховували за методикою Livak K. (2008). Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної мікроРНК нормалізували відносно Ct ендogenous контролю (далі – у.о.). Зміну експресії мікроРНК в певну кількість разів порівняно з контролем обчислювали за формулами $2^{-\Delta Ct}$.

Статистичні методи. Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми Statistica 6.0 компанії "Statistica Inc. " (USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. Перевірку статистичної гіпотези про нормальність розподілу здійснювали з використанням критерію Шапіро-Уїлка. З метою порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою використовували t-критерій Стюдента або U-критерій Манн-Уїтні. Аналіз спряженості ознак проводили з використанням методу Хі-квадрат. Для оцінки зв'язку експресії досліджених маркерів з клініко-патологічними характеристиками РПЗ проводили з використанням коефіцієнту Спірмена. Виживаність хворих аналізували за методом Каплана-Мейєра, достовірність між кривими – з використанням логарифмічного рангового тесту. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартна помилка середнього або у вигляді відсоткового співвідношення для відносних величин. Критичний рівень статистичної значимості приймали рівним 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ різного ступеня злоякісності. Метою першого етапу роботи була оцінка ступеня злоякісності клітинних ліній РПЗ DU-145 та LNCaP за такими молекулярно-біологічними характеристикам як рецепторний статус (експресія AR, ER α , ER β , PR, Her2/neu), експресія маркерів адгезії (експресія E- та N-кадгерину, CD44), проліферативна (експресія Ki-67) та інвазивна активність, яку досліджували методом transwell-інвазії (MartigelTM). Встановлено, що досліджені клітинні лінії РПЗ людини характеризувались наявністю рецепторів до стероїдних гормонів та HER2/neu (табл. 2). Високий рівень експресії AR визначено як в клітинах лінії DU-145 ($282,0 \pm 14,0$ балів H-Score), так і в клітинах лінії LNCaP ($270,0 \pm 8,0$ балів H-Score). В клітинах обох досліджених ліній також встановлено високий рівень експресії ER β , низький рівень ER α та середній рівень PR. Не виявлено достовірних відмінностей між експресією HER2/neu у лініях DU-145 та LNCaP ($84,0 \pm 11,3$ та $94,0 \pm 4,0$ балів H-Score відповідно).

Аналіз маркерів адгезії клітин РПЗ виявив, що в клітинах обох досліджених ліній визначається низька експресія Е-кадгерину (табл. 2). Рівень експресії N-кадгерину був достовірно вищий у клітинах LNCaP ($p < 0,05$), в той час як експресія CD44 була більшою у 2,8 разу ($p < 0,05$) у клітинах лінії DU-145 (табл. 2).

Таблиця 2

Молекулярно-біологічні особливості клітин ліній РПЗ людини

	DU-145	LNCaP
Рецепторний статус, бали H-Score		
AR	282,0±14,0	270,0±8,0
ERα	80,0±13,0	98,0±12,0
ERβ	276,0±9,3	280,0±10,6
PR	117,0±18,0	150,0±17,6
HER2neu	84,0±11,3	94,0±4,0
Маркери адгезії та проліферації, бали H-Score		
CD44	255,0±15,3	92,0±15,3*
Е-кадгерин	35,0±6,6	3,0±1,0
N-кадгерин	175,0±12,7	247±11,6*
Ki-67	265,0±20,5	174±24,6*
Інвазивна активність, $\times 10^3$ клітин		
	0,387	0,076*

Примітка. * - $p < 0,05$ у порівнянні з клітинами лінії DU-145

Клітини лінії DU-145 також характеризувались значно вищою проліферативною (Ki-67: 265,0±20,5 балів за H-Score) та інвазивною активністю ($0,387 \times 10^3$ клітин), порівняно з клітинами лінії LNCaP, у яких рівень Ki-67 становив 174,0±24,6 бали H-Score, а показник інвазивної активності дорівнював $0,076 \times 10^3$ клітин.

Таким чином, проведене дослідження показало, що клітинам лінії DU-145 властивий високий ступінь злоякісності, оскільки вони характеризуються низькими адгезивними характеристиками, а також високою проліферативною і інвазивною активністю у порівнянні з клітинами лінії LNCaP.

Зв'язок експресії ЛФ і маркерів ПСК зі ступенем злоякісності клітин РПЗ. Визначення експресії маркерів ПСК продемонструвало, що рівень експресії CD44 у клітинах РПЗ високого ступеня злоякісності становив 255,0±15,3 балів H-Score, а CD24 – 20,0±5,6 балів H-Score (рис. 1). Клітини лінії LNCaP низького ступеня злоякісності характеризувалися низькими рівнями експресії CD44 та CD24 (92,0±15,3 та 12,0±4,0 бали H-Score відповідно). Дослідження показників мРНК NANOG продемонструвало у 3,2 раза ($p < 0,05$) вищий рівень в клітинах DU-145 проти такого у клітинах LNCaP. Отже, клітинам лінії високого ступеня злоякісності DU-145 властиві фенотипові ознаки ПСК (CD44^{high}CD24^{low}).

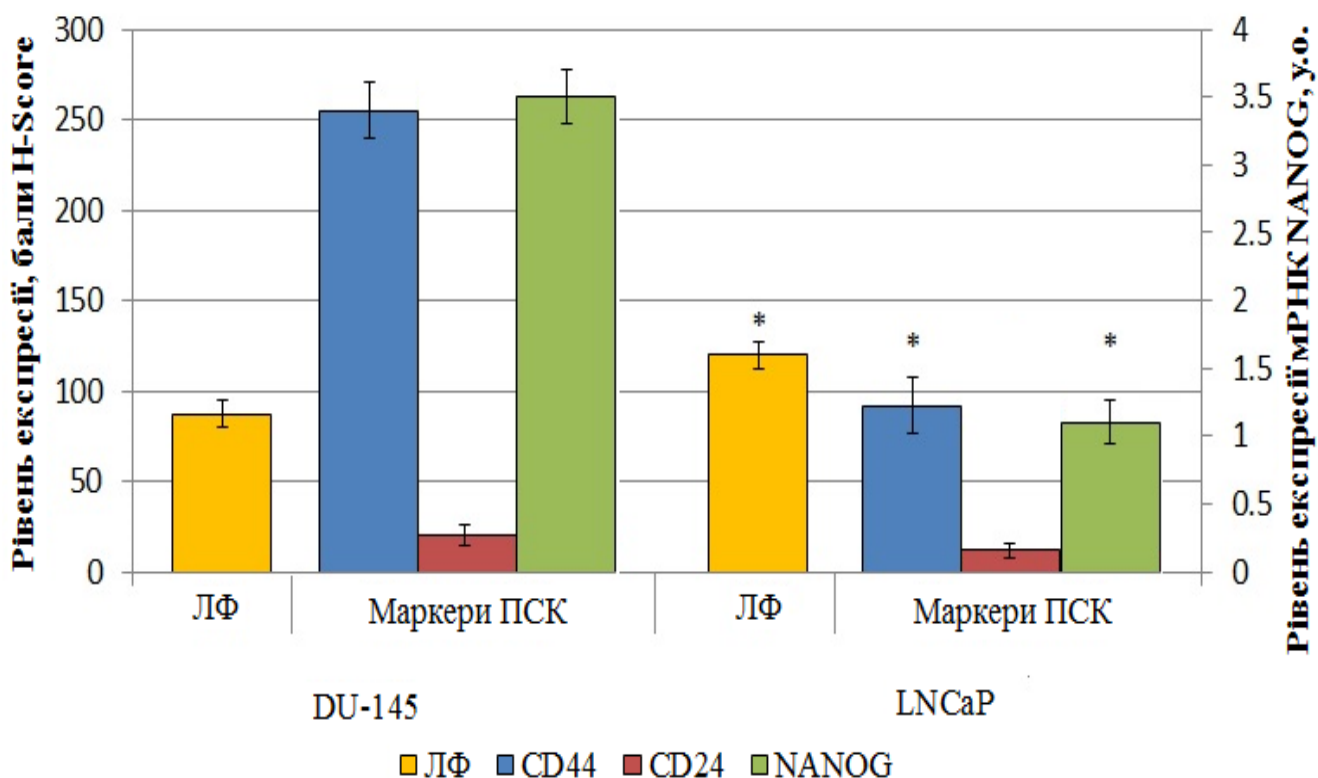


Рис. 1. Статус експресії маркерів ПСК, ЛФ та мРНК NANOG в клітинах ліній РПЗ людини

Примітка. * - $p < 0,05$ у порівнянні з клітинами лінії DU-145

Певні відмінності також встановлено при вивченні особливостей експресії ЛФ у клітинах досліджених ліній РПЗ. Визначено, що клітини низького ступеня злоякисності лінії LNCaP характеризувалися середніми показниками експресії ЛФ ($120,0 \pm 7,5$ балів H-Score), в той час як рівень експресії цього глікопротеїну в клітинах лінії високого ступеня злоякисності DU-145 був в 1,4 рази нижчим ($p < 0,05$) і становив $87,0 \pm 7,5$ балів H-Score. Таким чином, високий ступінь злоякисності клітин РПЗ людини асоціюється із наявністю клітин із фенотипом ПСК та низькими показниками експресії ЛФ.

Особливості експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякисності. Враховуючи важливе значення епігенетичної складової у формуванні ступеня злоякисності, на наступному етапі проведено дослідження показників мікроРНК, які приймають участь у регуляції експресії рецепторів стероїдних гормонів, молекул міжклітинної адгезії, ЛФ, проліферативної та інвазивної активності клітин РПЗ людини. Згідно з отриманими даними (табл. 3), клітини високого ступеня злоякисності лінії DU-145 характеризуються достовірно більшими показниками експресії онкогенних мікроРНК -21, -199a, -205 та 214 (у 1,3; 2,4; 1,3 та 1,5 рази відповідно) та зниженням у 1,6 рази рівня онкосупресорної мікроРНК-320 порівняно з такими у клітинах LNCaP ($p < 0,05$).

Профіль експресії мікроРНК у клітинах РПЗ людини різного ступеня злоякісності

	DU-145	LNCaP
Онкогенні мікроРНК (у.о.)		
МікроРНК-21	0,36±0,02	0,28±0,02*
МікроРНК-199a	4,21±0,25	1,72±0,17*
МікроРНК-205	25,0±1,03	20,0±1,07*
МікроРНК-214	1,49±0,21	1,03±0,12*
Онкосупресорні мікроРНК (у.о.)		
МікроРНК-let7	3,37±0,22	3,58±0,25
МікроРНК-200b	1,93±0,20	1,68±0,01
МікроРНК-320	4,29±0,11	6,74±0,25*

Примітка:* - $p < 0,05$ у порівнянні з клітинами лінії DU-145

Отже, в експериментальних дослідженнях *in vitro* ідентифіковано молекулярні маркери та мікроРНК, що асоційовані з потенціалом злоякісності клітин РПЗ. Виявлені достовірні відмінності змін у показниках ЛФ та маркерів ПСК у клітинах різного ступеня злоякісності стали підґрунтям для вивчення особливостей їх експресії в пухлинах хворих на РПЗ.

Результати ретроспективного клінічного дослідження.

Зв'язок показників експресії ЛФ зі ступенем розповсюдженості РПЗ.

При дослідженні топології експресії ЛФ у тканині РПЗ встановлено, що цей глікопротеїн визначався у більшості клітин збережених залоз та в поодиноких або невеликих групах злоякісно трансформованих клітин. Найчастіше його локалізацію відмічали в апікальній зоні клітин РПЗ. Експресія ЛФ також була ідентифікована у клітинах РПЗ, які знаходились в люмінальному просвіті залози, а також невеликих люмінальних тільцях.

Вивчення кількісних показників експресії ЛФ показало, що клітини РПЗ характеризуються низьким рівнем цього протеїну, який визначався у 63,3% досліджених випадків. Відповідно до наведених даних (табл. 4), рівень ЛФ був у 1,4 ($p < 0,05$) та 1,8 ($p < 0,05$) рази вищим у хворих на II стадію пухлинного процесу у порівнянні з РПЗ III та IV стадії, відповідно. У хворих із T2 категорією новоутворень був у 1,7 ($p < 0,05$) та 1.6 ($p < 0,05$) рази вищим порівняно з пацієнтами із T3 та T4 новоутвореннями. У хворих із метастазами у РЛВ експресія ЛФ в пухлинній тканині була у 1,4 рази ($p < 0,05$) нижчою, ніж у хворих, в яких вони були відсутні. Достовірної різниці показників експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих залежно від суми балів за Глісоном не виявлено. У пацієнтів із концентрацією ПСА меншою ніж 10 нг/мл, рівень експресії ЛФ був у 2,0 рази ($p < 0,05$) вищим у порівнянні з хворими із рівнем ПСА більшим 10 нг/мл. Встановлені відмінності у показниках експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих із різними клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу стали

підставою для проведення кореляційного аналізу, результати якого подані в табл. 4.

Таблиця 4

Зв'язок експресії ЛФ з клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ

Клінічні показники		Рівень експресії ЛФ (бали H-Score)	Коефіцієнт кореляції, ρ
Стадія	II	103,3 $\pm$ 9,8	-0,55 ($p < 0,05$)
	III	72,6 $\pm$ 7,3	
	IV	56,0 $\pm$ 4,7	
Категорія T за TNM	T2	99,4 $\pm$ 8,2	-0,48 ($p < 0,05$)
	T3	57,0 $\pm$ 9,5*	
	T4	60,6 $\pm$ 7,3*	
Категорія N за TNM	Наявні	63,6 $\pm$ 7,3	-0,52 ($p < 0,05$)
	Відсутні	92,0 $\pm$ 10,0*	
Сума балів за Глісоном	<7 балів	80,5 $\pm$ 8,0	-0,18 ($p > 0,05$)
	≥ 7 балів	69,3 $\pm$ 6,6	
Рівень ПСА	<10 нг/мл	105,0 $\pm$ 10,1*	-0,39 ($p < 0,05$)
	>10 нг/мл	52,6 $\pm$ 6,2	

Примітка. * $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РПЗ

Визначення зв'язку між наявністю ПСК у пухлинній тканині та клініко-патологічними особливостями РПЗ

При аналізі експресії CD24 та CD44 у клітинах РПЗ встановлено, що наявність клітин із фенотипом ПСК (CD44⁺CD24^{-low}) визначається у 44,2 % випадків. Експресія CD44 визначалась виключно на плазматичній мембрані клітин РПЗ, у той час як експресія CD24 – як на клітинній мембрані, так і в цитоплазмі клітин РПЗ. Найбільша частота клітин із фенотипом ПСК була виявлена за наявності високого доопераційного рівня ПСА в сироватці крові хворих (55,8 % випадків), у пацієнтів з РПЗ IV стадії (61,1 % випадків), пухлини в яких визначався високий індекс Глісона (55,3 % випадків) та проростали у навколишні тканини та органи (72,7 % випадків) (рис. 2).

Середній рівень експресії мРНК NANOG у пухлинних клітинах хворих загальної групи становив 4,18 $\pm$ 0,65 у.о. Усіх хворих було розподілено на 2 групи залежно від рівня експресії мРНК NANOG. Першу групу склали хворі із рівнем експресії мРНК NANOG меншим 4 у.о., а другу – із значенням вищим за 4 у.о. Середній рівень експресії мРНК NANOG у першій групі хворих становив 2,12 $\pm$ 0,16 у.о. з індивідуальними коливаннями від 0,11 $\pm$ 0,03 у.о. до 3,68 $\pm$ 0,15 у.о., а в другій групі був у 4,09 раза вищим і дорівнював 8,68 $\pm$ 1,24 у.о. з індивідуальними коливаннями від 4,59 $\pm$ 0,26 у.о. до 15,24 $\pm$ 0,36 у.о. При аналізі зв'язку рівнів

експресії мРНК NANOG з основними клініко-патологічними характеристиками пацієнтів 2 групи, найвищі показники експресії мРНК NANOG зафіксовано у хворих, пухлини яких які виходили за межі капсули органу ($10,4 \pm 1,7$ у.о., $p=0,72$), за наявності метастатичного ураження РЛВ ($11,6 \pm 1,4$ у.о., $p=0,72$), суми балів за Глісоном більшою ніж 7 ($13,4 \pm 1,2$ у.о., $p=0,54$) та доопераційним рівнем ПСА більше 10 нг/мл ($11,1 \pm 1,7$ у.о., $p=0,64$) (табл. 5).

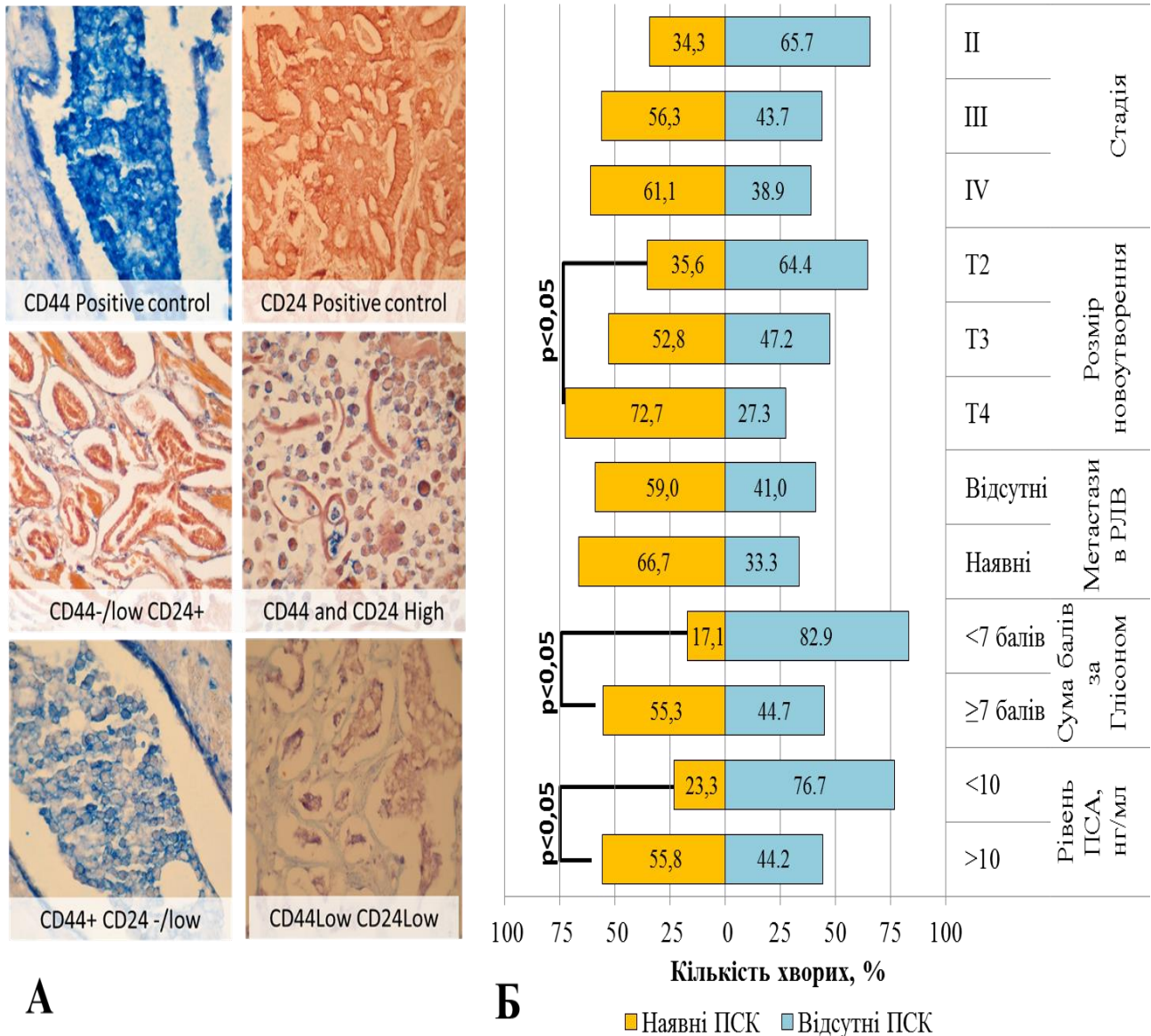


Рис. 2. Особливості експресії маркерів ПСК у тканині РПЗ. **А** – Експресія маркерів ПСК: CD44 (синій) та CD24 (червоний). Подвійна мітка. Імуногістохімія. Зб. х400; **Б** – Зв'язок між статусом ПСК з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ.

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ЛФ та маркерів ПСК з показниками агресивності пухлинного процесу, було проаналізовано безрецидивну виживаність хворих на РПЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Як видно з наведених даних, достовірне зниження

показників дворічної безрецидивної виживаності на 22 % та 27 % встановлено у хворих з відсутністю експресії ЛФ та наявністю клітин з фенотипом ПСК у тканині РПЗ ($p<0,05$) (рис. 3).

Таблиця 5

Зв'язок рівня експресії мРНК NANOG у пухлинній тканині хворих на РПЗ з основними клініко-патологічними характеристиками пацієнтів

Клінічні показники		Рівень експресії мРНК NANOG, у.о.	Коефіцієнт кореляції, ρ
Категорія Т за TNM	T2	$7,0\pm1,2$	0,72 ($p<0,05$)
	T3	$10,4\pm1,7^*$	
Категорія N за TNM	Наявні	$11,6\pm1,4^*$	0,75 ($p<0,05$)
	Відсутні	$5,4\pm0,4$	
Сума балів за Глісоном	<7 балів	$6,2\pm0,6$	0,54 ($p<0,05$)
	≥ 7 балів	$13,4\pm1,2^*$	
Рівень ПСА	<10 нг/мл	$6,1\pm0,5$	0,64 ($p<0,05$)
	>10 нг/мл	$11,1\pm1,7^*$	

Примітка. * - $p<0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РПЗ

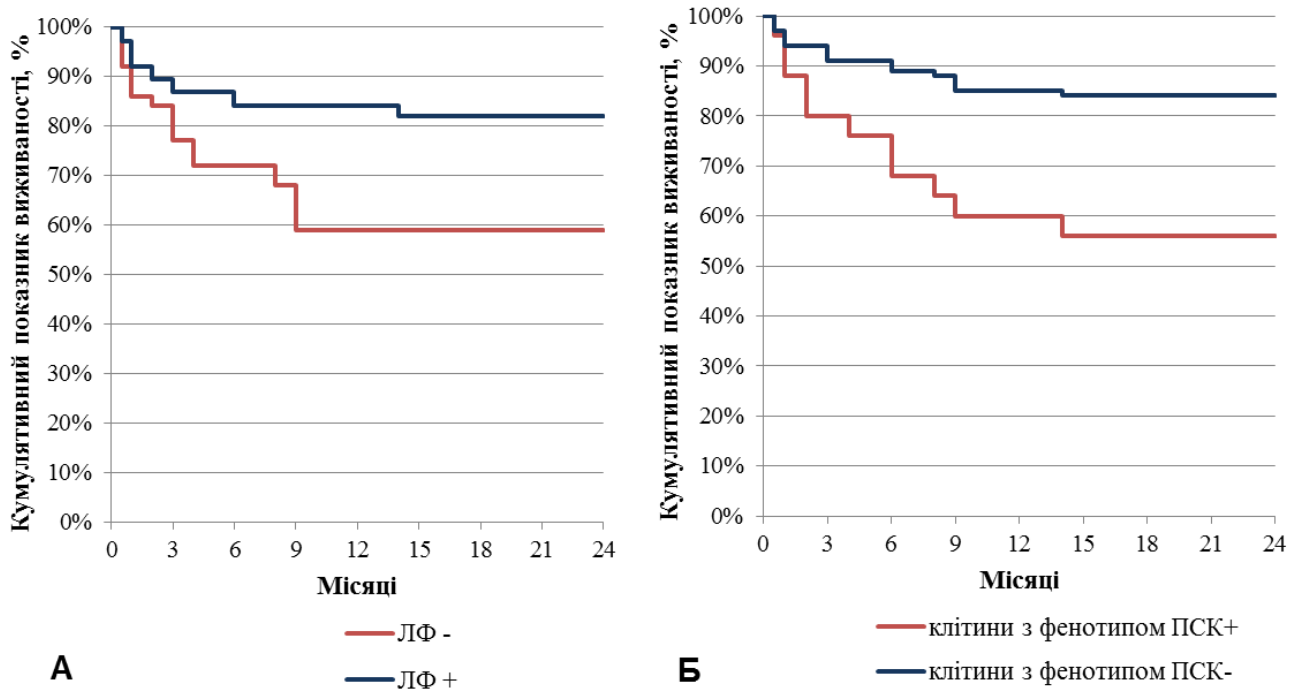


Рис. 3. Безрецидивна виживаність хворих залежно від наявності експресії ЛФ (А) та клітин з фенотипом ПСК (Б) у тканині РПЗ за методом Каплана–Мейєра (log-rank test)

Таким чином, відсутність експресії ЛФ та наявність клітин із фенотипом ПСК у пухлинній тканині асоціюється з несприятливим перебігом РПЗ, який за клініко-

патологічними показниками відрізняється високим ступенем злоякісності.

Особливості експресії пухлинних та циркулюючих мікроРНК-205 та -214, асоційованих зі ступенем злоякісності РПЗ. З метою виявлення епігенетичних порушень регуляції експресії ЛФ та ПСК було проведено вивчення особливостей експресії мікроРНК-214 та -205 в пухлинній тканині та сироватці крові 113 хворих на РПЗ проспективної групи (табл. 6). Виявлено, що рівень експресії циркулюючих та пухлинно-асоційованих мікроРНК-205 та -214 був достовірно меншим у хворих на РПЗ II стадії порівняно із показниками хворих III та IV стадій, у хворих із категорією T2 порівняно з пацієнтами категорії T3, у хворих із метастазами у РЛВ порівняно з пацієнтами категорії N₀. Достовірно вищий рівень експресії мікроРНК-205 та -214 встановлено у сироватці крові та пухлинних клітинах пацієнтів із показниками ПСА > 10 нг/мл, ніж у хворих із рівнем ПСА <10 нг/мл, а також у хворих за наявності новоутворень з сумою балів за Глісоном >7 проти відповідного показника пацієнтів із пухлинами з сумою балів за Глісоном <7. Аналіз зв'язку показників циркулюючих та пухлинних мікроРНК із клініко-патологічними характеристиками РПЗ дозволив визначити деякі достовірні залежності (табл. 6).

Таким чином, нами встановлено, що рівень експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 прямо корелює з такими показниками злоякісності РПЗ як стадія, наявність метастазів у РЛВ, сума балів за Глісоном та рівень ПСА у сироватці крові.

Отже, у результаті комплексного дослідження у системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі ідентифіковано молекулярно-біологічні та епігенетичні маркери, асоційовані зі ступенем злоякісності РПЗ. Обґрунтовано можливість використання показників експресії ЛФ, маркерів ПСК та пухлино-асоційованих мікроРНК-205 та -214 для більш детальної характеристики пухлинного процесу у передміхуровій залозі та в якості об'єктивних критеріїв для прогнозування агресивності перебігу РПЗ. Виявлені кореляції між рівнем експресії циркулюючих мікроРНК-205 та -214 з такими показниками злоякісності РПЗ як ступінь розповсюдженості пухлинного процесу та сума балів за Глісоном вказують на їх потенційну можливість застосування для малоінвазивного моніторингу перебігу пухлинного процесу.

Таблиця 6

Зв'язок рівнів циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ

Клінічні показники		Сироватка крові				Пухлинна тканина			
		мікроРНК-205 у.о.	мікроРНК-214 у.о.	мікроРНК-205	мікроРНК-214	мікроРНК-205 у.о.	мікроРНК-214 у.о.	мікроРНК-205 у.о.	мікроРНК-214 у.о.
Середнє значення		2,98±0,37	1,15±0,21	Коефіцієнт кореляції		10,85±1,3	1,25±0,09	Коефіцієнт кореляції	
Стадія	II	2,36±0,30	0,75±0,20	$\rho = 0,63$; $p < 0,05$	$\rho = 0,55$; $p < 0,05$	6,90±0,73	0,76±0,12	$\rho = 0,47$; $p < 0,05$	$\rho = 0,52$; $p < 0,05$
	III	3,09±0,27 ²	1,23±0,27 ²			11,31±1,23 ²	1,26±0,21 ²		
	IV	3,52±0,15 ²	1,54±0,10 ²			14,60±1,31 ^{2,3}	1,63±0,10 ^{2,3}		
Категорія Т за TNM	T2	2,21±0,30	0,82±0,16	$\rho = 0,37$; $p > 0,05$	$\rho = 0,18$; $p > 0,05$	6,53±0,46	1,04±0,14	$\rho = 0,22$; $p > 0,05$	$\rho = 0,43$; $p > 0,05$
	T3	3,34±0,37 ¹	1,26±0,19 ¹			13,57±1,32 ¹	1,41±0,16 ¹		
	T4	3,61±0,26	1,42±0,05			14,60±0,98	1,43±0,18		
Категорія N за TNM	Наявні	3,32±0,30	1,53±0,24	$\rho = 0,50$; $p < 0,05$	$\rho = 0,63$; $p < 0,05$	13,8±1,49	1,37±0,10	$\rho = 0,42$; $p < 0,05$	$\rho = 0,56$; $p < 0,05$
	Відсутні	2,64±0,24 ¹	0,76±0,15 ¹			7,30±0,87 ¹	1,04±0,11 ¹		
Сума балів за Глісоном	<7 балів	2,63±0,26	0,85±0,12	$\rho = 0,39$; $p < 0,05$	$\rho = 0,45$; $p < 0,05$	10,60±1,02	1,10±0,12	$\rho = 0,44$; $p < 0,05$	$\rho = 0,39$; $p < 0,05$
	≥7 балів	3,36±0,12 ¹	1,47±0,21 ¹			11,20±0,79 ¹	1,44±0,14 ¹		
Рівень ПСА	<10 нг/мл	2,56±0,23	0,87±0,17	$\rho = 0,48$; $p < 0,05$	$\rho = 0,52$; $p < 0,05$	7,44±0,65	1,08±0,12	$\rho = 0,57$; $p < 0,05$	$\rho = 0,37$; $p < 0,05$
	>10 нг/мл	3,40±0,20 ¹	1,41±0,19 ¹			12,8±1,20 ¹	1,36±0,09 ¹		

Примітка: ¹ - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РПЗ,

² - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РПЗ II стадії,

³ - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РПЗ III стадії.

ВИСНОВКИ

Варіабельність клінічного перебігу РПЗ вказує на необхідність пошуку факторів, які дозволять прогнозувати агресивний потенціал новоутворень, з урахуванням біологічних особливостей пухлинних клітин та є одним із пріоритетних напрямків досліджень в сучасній онкоурології. В теперішній час активно проводяться дослідження нових епігенетичних та молекулярно-біологічних маркерів, асоційованих із патогенезом цієї форми раку. Вивчення молекулярно-біологічних особливостей пухлинних клітин може допомогти у розумінні природи злоякісного процесу, а також самостійно або в комплексі з іншими загальноновизнаними показниками розкрити додаткові механізми пухлинного росту і лягти в основу оптимізації діагностики та оцінки агресивності РПЗ.

1. В експериментальній системі *in vitro* встановлено фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності. Визначено, що клітини ліній LNCaP та DU-145 суттєво відрізняються за проліферативною активністю, адгезивними та інвазивними властивостями. Високі показники експресії Ki-67 ($265,0 \pm 20,5$ балів H-Score) та CD44 ($255,0 \pm 15,3$ балів H-Score) на тлі високого ступеня інвазії ($0,387 \times 10^3$ клітин) визначено у лінії РПЗ людини DU-145, що вказує на високий потенціал злоякісності цих клітин порівняно з клітинами лінії LNCaP.

2. Доведено, що ступінь злоякісності у клітинах ліній РПЗ людини асоціюється з рівнем експресії маркерів ПСК та ЛФ. Про це свідчить наявність клітин з фенотипом ПСК ($CD44^{high}CD24^{low}$, мРНК NANOG – $3,5 \pm 0,2$ у.о) та середні показники експресії ЛФ ($120,0 \pm 7,5$ балів H-Score) у клітинах високого ступеня злоякісності лінії DU-145 порівняно з клітинами низького ступеня злоякісності лінії LNCaP з низьким рівнем експресії ЛФ ($87,0 \pm 8,0$ балів H-Score) та відсутністю клітин з фенотипом ПСК ($CD44^{low}CD24^{low}$, мРНК NANOG – $1,1 \pm 0,16$ у.о.).

3. Ідентифіковано профіль експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК у клітинах ліній РПЗ низького та високого ступеня злоякісності. Встановлено, що в клітинах РПЗ людини високого ступеня злоякісності лінії DU-145 спостерігається вища експресія онкогенних мікроРНК-21 (у 1,3 разу, $p < 0,05$), мікроРНК-199а (у 2,4 разу, $p < 0,05$), мікроРНК-205 (у 1,3 разу, $p < 0,05$) та мікроРНК-214 (у 1,5 разу, $p < 0,05$) та нижчий рівень експресії онкосупресорної мікроРНК-320а (у 1,6 разу, $p < 0,05$) порівняно з клітинами низького ступеня злоякісності лінії LNCaP.

4. З'ясовано особливості топології експресії ЛФ у тканині РПЗ та встановлено, що більшість досліджених випадків (63,3 %) характеризуються низьким рівнем експресії цього протеїну. Виявлено, що низька експресія ЛФ асоціюється зі зростанням стадії РПЗ ($r = -0,55$; $p < 0,05$), збільшенням категорії Т новоутворень ($r = -0,48$; $p < 0,05$), наявністю метастазів у РЛВ ($r = -0,52$; $p < 0,05$) та підвищенням рівня ПСА у сироватці крові хворих ($r = -0,39$; $p < 0,05$).

5. У 44,2 % досліджених випадків РПЗ ідентифіковано наявність клітин з

фенотипом ПСК (CD44⁺/highCD24⁻/low). Встановлено достовірно вищу частоту пухлин, позитивних за маркерами ПСК, у хворих на РПЗ з високими показниками ПСА у сироватці крові (55,8%), з новоутвореннями низького ступеня диференціювання (55,3 %), що проростають в навколишні тканини та органи (72,7 %).

6. Встановлено гетерогенний характер експресії мРНК NANOG у пухлинній тканині РПЗ із середнім показником $4,18 \pm 0,65$ у.о. та виявлено кореляційний зв'язок між його рівнем та такими клініко-патологічними характеристиками РПЗ як доопераційний рівень ПСА в сироватці крові ($\rho=0,64$; $p<0,05$), категорія Т за TNM ($\rho=0,72$; $p<0,05$), наявність метастазів у РЛВ ($\rho=0,75$; $p<0,05$).

7. Загальна 2-річна безрецидивна виживаність хворих на РПЗ є достовірно меншою за наявності експресії маркерів ПСК (CD44^{high}CD24^{low}, мРНК NANOG ≥ 4 у.о.) та відсутності експресії ЛФ у пухлинних клітинах ($p<0,05$).

8. Доведено зв'язок показників експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 зі ступенем злоякісності РПЗ та такими клініко-патологічними характеристиками з хворих на РПЗ як стадія пухлинного процесу ($\rho=0,63$, $\rho=0,55$ та $\rho=0,47$, $\rho=0,52$; $p<0,05$), наявність метастазів у РЛВ ($\rho=0,50$, $\rho=0,63$ та $\rho=0,42$, $\rho=0,56$; $p<0,05$), сума балів за Глісоном ($\rho=0,39$, $\rho=0,45$ та $\rho=0,44$, $\rho=0,39$; $p<0,05$) та передопераційний рівень ПСА в сироватці крові ($\rho=0,48$, $\rho=0,52$; та $\rho=0,57$, $\rho=0,37$; $p<0,05$).

9. Обґрунтовано можливість використання показників ЛФ, маркерів ПСК, мікроРНК-205 та мікроРНК-214 для прогнозування агресивності перебігу РПЗ та ризику виникнення рецидиву захворювання.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Chekhun V. F., Lukianova N. Yu., Polishchuk L. Z., Nalieskina L. A., Zadvornyi T. V., Storchai D. M., Todor I. N., Sobchenko S. O., Demash D. V., Yalovenko T. M., Borikun T. V., Lozovska Yu. V., Vitruk Yu. V., Chepurnatyi M. V., Pikul M. V., Stakhovsky O. E., Voilenko O. A., Stakhovsky E. O. The role of lactoferrin expression in initiation and progression of most common hormone-dependent cancers // Horizons in Cancer Research. - 2017. - V. 66, № 3. - P. 51-85. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження експресії лактоферину, аналіз літературних джерел за темою дослідження, участь у написанні та оформленні розділу монографії)*

2. Zhylchuk Yu.V., Vozianov S.O., Zadvornyi T. V., Sakalo V.S., Sakalo A.V., Grygorenko V.N., Lukianova N.Yu., Chekhun V.F. Prognostic value of cancer stem cell markers (CD44 and CD24) in combination with clinical and morphological characteristics of prostate cancer // Ijsrm Human. - 2017. - V. 6, № 3. - P. 20-30. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, дослідження експресії маркерів пухлинних стовбурових клітин залежно від клініко-патологічних характеристик хворих на РПЗ, участь у написанні та оформленні статті)*

3. Zadvorniy T.V., Lukianova N.Y., Borikun T.V., Chekhun V.F. Effects of exogenous lactoferrin on phenotypic profile and invasiveness of human prostate cancer cells (DU-145 and LNCAP) in vitro // *Experimental Oncology*. - 2018. - V. 40, №3. - P 184–186. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел та результатів власного дослідження, імуноцитохімічне дослідження експресії рецепторів стероїдних гормонів, молекул адгезії, Ki-67, в клітинах ліній РПЗ людини, участь у написанні та оформленні статті)*

4. Задворний Т.В., Борікун Т.В., Лук'янова Н.Ю., Вітрук Ю.В., Стаховський Е.О. МікроРНК-126, -205, -214 при доброякісних і злоякісних новоутвореннях передміхурової залози: обґрунтування можливого діагностичного та прогностичного значення // *Онкологія*. - 2019, Т 21, № 1. -С. 10-16. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, вивчення експресії мікроРНК-126, -205, -214 в пухлинній тканині та сироватці крові хворих на РПЗ, участь у написанні та оформленні статті)*

5. Lozovska Yu.V., Naleskina L.A., Zadvorniy T.V., Andrusishina I.M., Zhulkevych I.V., Stakhovskiy E.O., Kunska L.M., Lukianova N.Yu. Relationship aggressiveness of prostate cancer with tumor-associated serum markers. *Fiziologichnyi Zhurnal*. - 2019. - V 65, № 6. - P. 70-80. *(Дисертантом проведено імуноферментне дослідження рівнів лактоферину в сироватці крові хворих на РПЗ, аналіз отриманих результатів, участь у написанні та оформленні статті)*

6. Zadvorniy, T.V., Lukianova, N.Y., Borikun, T.V., Vitruk Yu,V., Stakhovsky, E.O., Chekhun, V. F. NANOG as prognostic factor of prostate cancer course. *Experimental Oncology*. - 2020. - V. 42, № 2. - P. 94-100. *(Дисертантом проведено підбір та аналіз літературних джерел за темою дослідження, ПЛР-аналіз показників мРНК NANOG в пухлинній тканині, імуногістохімічне дослідження експресії маркерів ПСК, Ki-67, рецепторів до андрогенів, участь у написанні та оформленні статті)*

7. Жильчук Ю.В., Сакало В.С., Григоренко В. М., Сакало А.В., Задворний Т.В. Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф. Експресія CD44 та CD24 у пухлинній тканині у хворих на рак передміхурової залози / *Здоров'я чоловіка*. - 2016. - № 4, С. 111-114. *(Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження експресії маркерів CD44 та CD24, аналіз літературних джерел за темою дослідження, участь у написанні та оформленні статті)*

8. Лук'янова Н.Ю., Борікун Т.В., Базась В.М., Яловенко Т.М., Задворний Т.В., Малишок Н.В., Россильна О.В. Циркуючі мікроРНК: перспективи використання для ранньої діагностики та моніторингу перебігу пухлинного процесу // *Онкологія*. - 2019. - Т 21, № 3, С. 181-191. *(Дисертантом проведено аналіз літературних джерел за темою дослідження, участь у написанні та оформленні статті)*

9. Патент України на корисну модель. Спосіб прогнозування ризику виникнення рецидивів у хворих на рак передміхурової залози / Чехун В.Ф., Жильчук Ю.В., Лук'янова Н.Ю., Сакало В.С., Сакало А.В. // Патент України на корисну модель № 120395, від. 25.10.2017. – Бюл. № 20. *(Дисертантом проведено аналіз результатів власного дослідження особливостей експресії маркерів*

пухлинних стовбурових клітин в тканині злоякісних новоутворень передміхурової залози, участь в оформленні патенту).

10. Спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на рак передміхурової залози. Інформаційний лист / В.Ф. Чехун, Н.Ю.Лук'янова, Т.В. Задворний // Київ. – МОЗ України. – 2018. - № 353. *(Дисертантом проведено дослідження особливостей експресії лактоферину в пухлинній тканині хворих на РПЗ, узагальнення отриманих результатів, оформлення інформаційного листа).*

11. В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Л.З. Поліщук, Т.В. Задворний, С.О. Собченко, Ю.В. Вітрук, М.В. Чепурнатий, О.Е. Стаховський, О.А. Войленко, Е.О. Стаховський / Дослідження експресії лактоферину в доброякісних і злоякісних пухлинах молочної та передміхурової залози // Наук.-практ. конф. “Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин”: тези доп., 15-16 жовтня 2015 р., Яремче. - Онкологія. - 2015. - Т. 17, № 3. - С. 199.

12. Т.В. Задворний, О.А. Кононенко, М.В. Пікуль, М.В. Чепурнатий, О.Е. Стаховський / Дослідження експресії лактоферину в доброякісних і злоякісних пухлинах передміхурової залози // Матеріали наук.-практ. конф. молодих вчених Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології”, 18 березня 2016 р., Київ. - Клиническая онкология. – 2016. – № 2 (22). – С. 68

13. Features of lactoferrin expression in malignant and non-malignant prostate tumors / V.F. Chekhun, T.V. Zadvornyi, N.Yu. Lukianova, A. E. Stakhovsky, E. A. Stakhovsky, Yu.V. Vitruk // 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference - September 3-7, 2016, Štrbské Pleso. - P. 79.

14. Т.В. Задворний, Ю.В. Жильчук, В.С. Сакало, В.Ф. Чехун / Зв'язок експресії маркерів ракових стовбурових CD44+/CD24- клітин з клініко-патологічними характеристиками раку передміхурової залози // XIII з'їзд онкологів та радіологів України, 26-28 травня 2016 р., Київ. Український радіологічний журнал. Спец. вип. 1. – С. 196.

15. Pattern of expression of cancer stem cells markers, CD44 and CD24, in malignant prostate tumors / V.F. Chekhun, Yu.V. Zhylchuk, T.V. Zadvornyi, N.Yu. Lukianova, R.A. Lytvynenko, Yu.V. Vitruk, M.V. Pikul, A.E. Stakhovsky, E.A. Stakhovsky // Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer: Intern. Sci. Conf.: Abstr., June13-15, 2016, Kyiv. - Experimental Oncology. – V. 38, № 2. – P. 131.

16. Н.Ю.Лук'янова, Л.З. Полищук, Т.В. Задворний, С.А. Собченко, М.В. Чепурнатый, А.Э. Стаховский, Ю.В. Витрук, О.А. Войленко, Э.А. Стаховский, В.Ф. Чехун / Особенности экспрессии лактоферрина в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной и предстательной железы // IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, 15-17 июня 2016 г., Минск. - Евразийский онкологический журнал. -Т. 2, № 4. - С. 306.

17. В.Ф. Чехун, Т.В. Задворний, Л.З. Поліщук, Н.Ю. Лук'янова, Ю.В. Вітрук, О.А. Кононенко, Р.А. Литвиненко, М.В. Пікуль, М.В. Чепурнатий, О.Е. Стаховський, Е.О. Стаховський Е.О. / Дослідження експресії лактоферину в доброякісних і злоякісних пухлинах передміхурової залози // XIII з'їзд онкологів та радіологів України, 26-28 травня 2016 р., Київ. Український радіологічний журнал. Спец. вип. 1. – С. 210.

18. T.V. Zadvornyi, N.Yu. Lukianova, V.F. Chekhun / Molecular profile features of prostate cancer cells with the CD44+/CD24- phenotype // International Scientific Conference "Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy, October 5-6, 2017, Kyiv. Experimental Oncology. - 2017. - V. 39, № 3. - P. 255.

19. Дослідження зв'язку експресії лактоферину з клініко-патологічними характеристиками хворих на рак передміхурової залози / В.В. Тіщенко, Т.В.Задворний, Н.Ю. Лук'янова, В.Ф. Чехун / Матеріали XVI міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances», 24-27 квітня 2018 р., Київ. - С. 271-272.

20. О. Мякушко, Т. Задворний, Т. Борікун, Д. Сторчай / Молекулярно-біологічні особливості клітин ліній раку передміхурової залози людини // Матеріали XVI міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances», 24-27 квітня 2018 р., Київ. - С. 266-268.

21. T. Zadvornyi, N. Lukianova, V. Chekhun / Study of the biological effects of lactoferrin on the prostate cancer cells with varying sensitivity to hormonal therapy // 5th European Congress of Immunology, 2-5 September, 2018, Amsterdam. ECI 2018- P. 249.

22. T. Zadvornyi, N. Lukianova, V. Chekhun / Exploration of lactoferrin biological effects on prostate cancer cells with different sensitivity to hormonal therapy // EFIS-EJI Tatra Immunology Conference " Molecular Determinants of T-Cell Immunity", June 9 - 13, 2018, Štrbské Pleso. - P. 111.

23. P.M. Vorobei, T.V. Zadvornyi, N.Yu. Lukianova, M.V. Chepurnatiy / Serum lactoferrin levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer // 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2018), October 19 – 22, 2018, Yerevan, - P. 38.

24. V.F. Chekhun, T.V. Zadvornyi, N.Y. Lukianova / Prognostic value of NANOG level in patients with prostate cancer // 6 th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, June 18-21, 2019, Yaremche. - P.112.

25. К. Дядюк, Т. Задворний / Порівняльний аналіз експресії CD44 в клітинах злоякісних новоутворень грудної та передміхурової залози // Матеріали XVII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances», 23-25 квітня 2019 р., Київ, 2019. - С. 128-130.

26. О.М. Мушій, Т.В. Задворний, Т.В. Борікун / Особливості експресії маркерів адгезії в клітинах раку передміхурової залози людини // Матеріали XVII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances», 23-25 квітня, Київ, 2019 р. - С. 137-138.

27. О. Мякушко, Т. Задворний, Т. Борікун / Вплив екзогенного лактоферину на проліферативну активність клітин ліній раку передміхурової залози людини // Матеріали XVII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances», 23-25

квітня 2019 р., Київ, - С. 139-140.

28. Т.В. Задворний / Прогностичне значення мікроРНК-126, -205 та -214 у хворих на рак передміхурової залози // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», 4–5 лютого 2019 р., Київ. Онкологія. - 2019. - Т. 21, № 1. - С. 62-63.

29. Т.В. Задворний, Н.Ю. Лук'янова, В.Ф. Чехун / Прогностичне значення рівня мРНК NANOG в пухлинній тканині у хворих на рак передміхурової залози // Матеріали науково-практичної конференції «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоналізованої терапії раку», 3–4 жовтня 2019 р., Київ. Онкологія. - 2019. - Т. 21, № 3. - С. 67-68.

АНОТАЦІЯ

Задворний Т.В. Молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані зі ступенем злоякісності раку передміхурової залози. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена актуальній проблемі онкології – виявленню молекулярно-біологічних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу.

В експериментальній системі *in vitro* ідентифіковано фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності. Визначено, що клітини ліній LNCaP та DU-145 суттєво відрізняються за проліферативною активністю, адгезивними та інвазивними властивостями. Встановлено, що ступінь злоякісності клітин ліній РПЗ людини асоціюється з рівнем експресії маркерів ПСК та ЛФ, а також достовірно більшими показниками експресії онкогенних мікроРНК -21, -199a, -205 та -214 і зниженням рівня експресії онкосупресорної мікроРНК-320. *Ex vivo* на клінічному матеріалі доведено зв'язок експресії ЛФ та маркерів ПСК зі ступенем злоякісності РПЗ. Встановлено, що низька експресія ЛФ корелює зі зростанням стадії РПЗ ($r=-0,55$; $p<0,05$), збільшенням категорії Т ($r=-0,48$; $p<0,05$), наявністю метастазів в РЛВ ($r=-0,52$; $p<0,05$) та підвищенням рівня ПСА у сироватці крові хворих ($r=-0,39$; $p<0,05$). Виявлено, що наявність клітин з фенотипом ПСК ($CD44^{+}/^{high}CD24^{-}/^{low}$) та високим рівнем експресії мРНК NANOG у пухлинній тканині характерна для пацієнтів із несприятливим перебігом РПЗ, який за клініко-патологічними показниками відрізняється високим ступенем злоякісності. Загальна 2-річна безрецидивна виживаність хворих на РПЗ є достовірно меншою за наявності експресії маркерів ПСК ($CD44^{+}/^{high}CD24^{-}/^{low}$, мРНК NANOG ≥ 4 у.о.) та відсутності експресії ЛФ у пухлинних клітинах ($p<0,05$). Доведено зв'язок показників експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 зі ступенем злоякісності РПЗ та такими клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ як стадія пухлинного процесу ($p<0,05$), наявність метастазів у РЛВ ($p<0,05$), сума балів за Глісоном ($p<0,05$) та передопераційний рівень ПСА в сироватці крові

($p < 0,05$). Отримані результати вказують на потенційну можливість використання показників ЛФ, маркерів ПСК, мікроРНК-205 та мікроРНК-214 для прогнозування агресивності перебігу РПЖ та ризику виникнення рецидиву захворювання.

Ключові слова: рак передміхурової залози, лактоферин, маркери пухлинних стовбурових клітин, мікроРНК-205, мікроРНК-214, ступінь злоякісності.

АННОТАЦИЯ

Задворный Т.В. Молекулярно-биологические признаки, ассоциированные со степенью злокачественности рака предстательной железы. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.01.07 - онкология. - Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, 2020.

Диссертация посвящена актуальной проблеме онкологии - поиску молекулярно-биологических и эпигенетических биомаркеров РПЖ человека, ассоциированных с агрессивностью течения опухолевого процесса.

В экспериментальной системе *in vitro* идентифицированы фенотипические и молекулярно-биологические признаки клеточных линий РПЖ человека разной степени злокачественности. Установлено, что клеточные линии LNCaP и DU-145 существенно отличаются по пролиферативной активности, адгезивным и инвазивным свойствам. Доказано, что степень злокачественности в клетках линий РПЖ человека ассоциируется с уровнем экспрессии маркеров ОСК и ЛФ а также достоверно большими показателями экспрессии онкогенных микроРНК -21, -199, -205 и -214 и снижением уровня экспрессии онкосупрессорной микроРНК-320. *Ex vivo* на клиническом материале доказана связь экспрессии ЛФ и маркеров ОСК со степенью злокачественности РПЖ. При исследовании топологии экспрессии ЛФ установлено, что этот гликопротеин определяется в большинстве клеток сохранных желез, а также в единичных или небольших скоплениях злокачественно трансформированных клеток. Наиболее часто локализация ЛФ идентифицируется в апикальной зоне клеток РПЖ. Показано, что клетки РПЖ характеризуются низким уровнем ЛФ в 63,3% исследуемых случаев. Установлено, что низкая экспрессия ЛФ ассоциируется с ростом стадии РПЖ ($r = -0,55$; $p < 0,05$), увеличением категории Т ($r = -0,48$; $p < 0,05$), наличием метастазов в РЛУ ($r = -0,52$; $p < 0,05$) и высоким уровнем ПСА в сыворотке крови больных ($r = -0,39$; $p < 0,05$). При анализе экспрессии CD24 та CD44 в клетках РПЖ установлено, что наличие клеток с фенотипом ОСК ($CD44^+CD24^{low}$) определяется в 44,2% случаев. Экспрессия CD44 определяется исключительно на плазматической мембране клеток РПЖ, в то время как экспрессия CD24 - как на клеточной мембране, так и в цитоплазме клеток РПЖ. Выявлено, достоверно более высокую частоту опухолей положительных по маркерам ОСК у больных РПЖ с высокими показателями ПСА в сыворотке крови (55,8%), с новообразованиями низкой степени дифференцирования (55,3%), которые прорастают в окружающие ткани и органы (72, 7%). Определена прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии мРНК NANOG в ткани РПЖ с такими основными клиничко-

патологическими характеристиками пациентов: категории Т и N по TNM классификации, сумма баллов по Глиссону и дооперационный уровень ПСА. Общая 2-летняя безрецидивная выживаемость больных РПЖ является достоверно меньше при наличии экспрессии маркеров ОСК ($CD44^{+/\text{high}}CD24^{-/\text{low}}$, мРНК NANOG ≥ 4 у.е.) и отсутствии экспрессии ЛФ в опухолевых клетках ($p < 0,05$). В ходе изучения эпигенетических нарушений регуляции экспрессии ЛФ и ОСК доказана связь показателей экспрессии циркулирующих и опухолевых микроРНК-205 и микроРНК-214 со степенью злокачественности РПЖ и такими клиничко-патологическими характеристиками больных как стадия опухолевого процесса ($\rho = 0,63$, $\rho = 0,55$ и $\rho = 0,47$, $\rho = 0,52$; $p < 0,05$), наличие метастазов в РЛУ ($\rho = 0,50$, $\rho = 0,63$ и $\rho = 0,42$, $\rho = 0,56$; $p < 0,05$), сумма баллов по Глиссону ($\rho = 0,39$, $\rho = 0,45$ и $\rho = 0,44$, $\rho = 0,39$; $p < 0,05$) и предоперационный уровень ПСА в сыворотке крови ($\rho = 0,48$, $\rho = 0,52$; и $\rho = 0,57$, $\rho = 0,37$; $p < 0,05$). Полученные результаты указывают на потенциальную возможность использования показателей ЛФ, маркеров ОСК, микроРНК-205 и микроРНК-214 для прогнозирования агрессивности течения РПЖ та риска возникновения рецидива заболевания.

Ключевые слова: рак предстательной железы, лактоферрин, маркеры опухолевых стволовых клеток, микроРНК-205, микроРНК-214, степень злокачественности.

SUMMARY

Zadvorny T.V. Molecular biological features associated with the malignancy degree of prostate cancer. - Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences in specialty 14.01.07 – oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the actual problem of oncology – identification of molecular-biological and epigenetic biomarkers of human prostate cancer (PC), associated with the aggressiveness of the tumor process.

In the *in vitro* experimental system, phenotypic and molecular-biological features of human PC cell lines of various degrees of malignancy were identified. It was determined that the LNCaP and DU-145 cells lines differ significantly in proliferative activity, adhesive and invasive properties. It was found that the malignancy degree of human PC cell lines is associated with the level of expression of markers CSC and LF, as well as significantly higher expression of oncogenic miR-21, -199a, -205, -214 and a decrease in the level of oncosuppressive miR-320. *Ex vivo* clinical evidence demonstrated an association between LF expression and CSC markers and the degree of PC malignancy. It was found that low LF expression correlates with an increase in the PC stage ($r = -0.55$; $p < 0.05$), an increase in the size of tumors ($\rho = -0.48$; $p < 0.05$), the presence of metastases in RLV ($r = -0.52$; $p < 0.05$) and an increase in the level of PSA in patients serum ($\rho = -0.39$; $p < 0.05$). It was found that the presence of cells with the CSC phenotype ($CD44^{+/\text{high}}CD24^{-/\text{low}}$) and high levels of NANOG miR expression in tumor tissue are characteristics of patients with an unfavorable course of PC, which has a high malignancy degree in clinical and pathological indicators. The overall 2-year recurrence-free survival of PC patients was significantly lower in the presence of CSC

markers (CD44^{+/high}CD24^{-/low}, NANOG mRNA ≥ 4 u.a.) and the absence of LF expression in tumor cells ($p < 0.05$). The relationship between the expression of circulating and tumor miR-205 and miR-214 with the PC malignancy degree and such clinical and pathological characteristics of patients as tumor process stage ($p < 0.05$), metastases in regional lymph nodes ($p < 0.05$), the Gleason score ($p < 0.05$) and preoperative PSA level in blood serum ($p < 0.05$) was shown. The obtained results indicate the potential possibility of using LF levels, CSC markers, miR-205 and miR-214 to predict the aggressiveness of the PC course and to estimate the risk of disease recurrence.

Key words: prostate cancer, lactoferrin, markers of cancer stem cells, miR-205, miR-214, the malignancy degree.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AR	- рецептор андрогенів
ER α	- рецептор естрогену α
ER β	- рецептор естрогену β
Her2/neu	- рецептор епідермального фактора росту
PR	- рецептор прогестерону
ЛФ	- лактоферин
ПЛР	- полімеразна ланцюгова реакція
ПСА	- простатичний специфічний антиген
ПСК	- пухлинні стовбурові клітини
РЛВ	- регіонарні лімфатичні вузли
РПЗ	- рак передміхурової залози