

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
Національна академія наук України

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЗАДВОРНИЙ ТАРАС ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 616.65 - 006: 577. 22.017

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.01.07 – онкологія

091 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____ Задворний Т.В.

Науковий керівник Лук'янова Наталія Юріївна, доктор біологічних наук,
старший дослідник

Київ – 2020 р

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.

Рак передміхурової залози (РПЗ) займає провідні позиції за показниками захворюваності та смертності в структурі онкологічних захворювань як в Україні, так і в світі. 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. Основними причинами незадовільних результатів лікування хворих на РПЗ є здатність до метастазування, хіміо- і гормонорезистентність, а також відсутність досконалих алгоритмів прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу. Дана дисертаційна робота присвячена виявленню молекулярно-біологічних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу.

В експериментальній системі *in vitro* встановлено, що досліджені клітинні лінії РПЗ людини характеризувались наявністю рецепторів до стероїдних гормонів та рецептора епідермального фактора росту людини 2 (HER2/neu). Високий рівень експресії рецептора андрогену (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 рецептора естрогену бета (ER β), низький рівень рецептора естрогену альфа (ER α) та середній рівень

рецептора прогестерону (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 E-кадгерину. 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. Клітини лінії DU-145 також характеризувались значно вищою проліферативною (Ki-67: $265,0 \pm 20,5$ балів за H-Score) та інвазивною активністю ($0,387 \times 10^3$ клітин), порівняно з клітинами лінії LNCaP, у яких рівень Ki-67 становив $174,0 \pm 24,6$ 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.

На клінічному матеріалі доведено та підтверджено власні експериментальні дані відносно зв'язку експресії лактоферину (ЛФ) і маркерів пухлинних стовбурових клітин (ПСК) зі ступенем злоякісності РПЗ. Визначення експресії маркерів ПСК продемонструвало, що рівень експресії CD44 у клітинах РПЗ високого ступеня злоякісності становив $255,0 \pm 15,3$ балів H-Score, а CD24 – $20,0 \pm 5,6$ балів H-Score. Клітини лінії LNCaP низького ступеня злоякісності характеризувалися низькими рівнями експресії CD44 та CD24 ($92,0 \pm 15,3$ та $12,0 \pm 4,0$ 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 ($CD44^{\text{high}}CD24^{\text{low}}$).

Певні відмінності також встановлено при вивченні особливостей експресії ЛФ у клітинах досліджених ліній РПЗ. Визначено, що клітини низького ступеня злоякісності 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 злоякісності 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 злоякісності клітин РПЗ людини асоціюється із наявністю клітин із фенотипом ПСК та низькими показниками експресії ЛФ.

Враховуючи важливе значення епігенетичної складової у формуванні ступеня злоякісності, 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, клітини високого ступеня злоякісності 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 ($p < 0,05$).

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.

Дослідженнями *ex vivo* на клінічному матеріалі доведено та підтверджено власні експериментальні дані відносно зв'язку експресії і маркерів ПСК зі ступенем злоякісності РПЗ. 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). 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. При аналізі зв'язку показників експресії ЛФ з клініко-патологічними характеристиками РПЗ встановлено, що рівень експресії цього білка 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 рівень ЛФ був в 1,7 ($p<0,05$) та 1,6 ($p<0,05$) рази більшим порівняно з пацієнтами із T3 та T4 новоутвореннями. У хворих із метастазами у регіональні лімфатичні вузли (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.

При аналізі експресії CD24 та CD44 у клітинах операційного матеріалу хворих на РПЗ встановлено, що наявність клітин із фенотипом ПСК ($CD44^{high}CD24^{low}$) визначається у 44,2% випадків. Експресію CD44 ідентифіковано 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).

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., $p=0,64$).

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ЛФ та маркерів ПСК з клініко-патологічними показниками, асоційованими з агресивністю пухлинного процесу, було проаналізовано безрецидивну виживаність хворих на РПЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. 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 ($p<0,05$).

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.

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. 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 .

Таким чином, нами встановлено, що рівень експресії циркулюючих та пухлинних мікроРНК-205 та мікроРНК-214 прямо корелює з такими показниками злоякісності РПЗ як стадія ($\rho = 0,63$, $\rho = 0,55$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,47$, $\rho = 0,52$; $p < 0,05$), наявність метастазів у РЛВ ($\rho = 0,50$, $\rho = 0,63$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,42$, $\rho = 0,56$) сума балів за Глісоном ($\rho = 0,39$, $\rho = 0,45$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,44$, $\rho = 0,39$) та рівень ПСА у сироватці крові ($\rho = 0,48$, $\rho = 0,52$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,57$, $\rho = 0,37$).

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.

SUMMARY

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

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

Prostate cancer (PCa) holds leading positions in morbidity and mortality in the structure of cancer in Ukraine and the world. Accumulated clinical experience allows us to conclude about the heterogeneity of PCa both in morphological structure and molecular profile, and in the clinical course, which requires different approaches to diagnosis and therapy. The main reasons for the unsatisfactory results of treatment of PCa patients are the ability to metastasize, chemo- and hormone resistance, as well as the lack of accurate algorithms for predicting the aggressiveness of the tumour process. This thesis is devoted to the detection of the molecular-biological and epigenetic biomarkers of human PCa associated with the aggressiveness of the tumour process.

In the experimental system *in vitro*, we established that examined human prostate cancer cell lines were characterized by the presence of steroid hormone receptors and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu). High levels of androgen receptor (AR) expression were detected in both DU-145 cells (282.0 ± 14.0 H-Score points) and LNCaP cells (270.0 ± 8.0 H-Score points). In the cells of both studied lines, a high level of estrogen receptor beta (ER β) expression, a low level of estrogen receptor alpha (ER α) and a medium level of progesterone receptor (PR) were also found. No significant differences were found between HER2/neu expression in the DU-145 and LNCaP cell lines (84.0 ± 11.3 and 94.0 ± 4.0 H-Score scores, respectively). Analysis of adhesion markers in prostate cancer cells revealed that both studied cell lines are characterized by the low expression of E-

cadherin. The level of expression of N- cadherin was significantly higher in cells LNCaP ($p < 0,05$), while the expression of CD44 was elevated by 2.8 times in ($p < 0,05$) in cell lines DU-145. DU-145 cells were also characterized by significantly higher proliferative (Ki-67 - 265.0 ± 20.5 H-Score) and invasive activity (0.387×10^3 cells) compared to LNCaP cells in which the Ki-level 67 was 174.0 ± 24.6 H-Score points, and the rate of invasive activity was 0.076×10^3 cells.

Thus, this study showed that cell line DU-145 has a high malignancy degree, as it is characterized by low adhesive properties and high proliferative and invasive activity compared to the cell line LNCaP.

The clinical material proved and confirmed our experimental data on the relationship between the expression of lactoferrin (LF) and markers of cancer stem cells (CSC) with the degree of malignancy of PCa. Determination of the expression of CSC markers showed that the level of CD44 expression in PCa cells with a high degree of malignancy was 255.0 ± 15.3 H-Score points and CD24 - 20.0 ± 5.6 H-Score points. Low-malignant LNCaP cells were characterized by low expression levels of CD44 and CD24 (92.0 ± 15.3 and 12.0 ± 4.0 H-Score, respectively). The NANOG mRNA study showed a 3.2- fold ($p < 0.05$) higher level in DU-145 cells versus that in LNCaP cells. Therefore, the cells of the line of high malignancy DU -145 also had phenotypic features of CSC ($CD44^{high} CD24^{low}$).

Certain differences were also found in the study of the features of LF expression in the cells of the studied PCa lines. It was determined that the cells of low malignancy degree LNCaP were characterized by average LF expression up to 120.0 ± 7.5 H-Score points, while the level of expression of this glycoprotein in the cells of the high malignancy degree DU-145 was 1.4 times lower ($p < 0,05$) and counted $87,0 \pm 7,5$ points H-score. Thus, high malignant degree of PCa cells is associated with the presence of cells with the CSC phenotype and low expression of LF.

Given the importance of epigenetic component in shaping the degree of malignancy, on the next phase, we conducted estimation of microRNA expression

which are taking part in the regulation of expression of steroid hormone receptors, intercellular adhesion molecules, LF, the proliferative and invasive cell activity of human prostate cancer. According to information received, cells of a high degree of malignancy DU-145 are characterized by significantly higher rates of expression of oncogenic microRNA-21, -199a, -205 and 214 (1.3, 2.4, 1.3 and 1.5 times and higher and 1.6 times decrease and level oncosuppressive miR-320a compared to those in LNCaP cell line ($p < 0.05$).

Therefore, *in vitro* experimental studies, we proved that levels of molecular markers and microRNAs expression are associated with the malignancy potential of PCa cells. The significant revealed differences in changes in LF parameters and markers of CSC in cells of different degrees of malignancy became the basis for studying the peculiarities of their expression in tumours of patients with PCa.

Ex vivo studies were conducted on clinical material and confirmed our experimental data on the expression of connection and CSC markers with the degree of malignancy of prostate cancer. The study of the topology and quantitative indicators of LF expression and markers of CSC to determine their clinical significance as markers of the tumour process was performed on PCa tissue samples of 120 patients with II-IV (retrospective group) stages of the disease. In the study of the topology of LF expression in PCa tissue, we found that this glycoprotein was determined in most cells of preserved glands and in single or small groups of malignantly transformed cells. We noted most of its localization on the apical zone of prostate cancer cells. LF expression was also identified in prostate cancer cells that were in the luminal lumen of glands and small luminal cells.

The study of quantitative indicators of LF expression showed that PCa cells are characterized by low levels of this protein, which was determined in 63.3% of the studied cases. In the analysis of the relationship of LF expression parameters with clinical and pathological characteristics of PCa, it was found that the expression level of this protein was 1.4 ($p < 0.05$) and 1.8 ($p < 0.05$) times higher in patients with II stage of the tumour process in comparison with PCa of III and IV

stages, respectively. In patients with T2 category of neoplasms, the level of LF was 1.7 ($p < 0.05$) and 1.6 ($p < 0.05$) times higher compared with patients with T3 and T4 neoplasms. In patients with metastases to regional lymph nodes, the expression of LF in tumour tissue was 1.4 times ($p < 0.05$) lower than in patients without metastases. There was no significant difference in the expression of LF in tumour tissue of patients depending on the sum of Gleason scores. In patients with a prostate-specific antigen (PSA) concentration of less than 10 ng/ml, the level of LF expression was 2.0 times ($p < 0.05$) higher compared with patients with a PSA level greater than 10 ng / ml.

Analysing the expression of CD24 and CD44 cells in surgical specimens of patients with prostate cancer, we found that the presence of cells and with CSC phenotype ($CD44^{high}CD24^{low}$) is determined in 44.2 % of the samples. CD44 expression was identified exclusively on the plasma membrane of PCa cells, while CD24 expression was identified both on the cell membrane and in the cytoplasm. The highest frequency of cells with the CSC phenotype was detected in the presence of high preoperative PSA levels in the serum of patients (55.8% of cases), in patients with IV stage (61.1% of cases), tumours in which a high Gleason index (55.3% of cases) and germinated in the surrounding tissues and organs (72.7% of cases).

The average level of expression of NANOG mRNA in tumour cells of patients of the general group was 4.18 ± 0.65 a.u. All patients were divided into 2 groups depending on the level of NANOG mRNA expression. The first group consisted of patients with a level of NANOG mRNA expression less than 4 a.u., and the second - with a value higher than 4 a.u.. The average level of NANOG mRNA expression in the first group of patients was 2.12 ± 0.16 a.u. with individual fluctuations from 0.11 ± 0.03 a.u. to 3.68 ± 0.15 a.u., and in the second group was 4.09 times higher and was equal to 8.68 ± 1.24 a.u. with individual fluctuations from 4.59 ± 0.26 a.u. up to 15.24 ± 0.36 a.u. When analysing the relationship of NANOG mRNA expression levels with the main clinical and pathological characteristics of patients of group 2, the highest NANOG mRNA

expression was recorded in patients whose tumours went beyond the capsule of the organ (10.4 ± 1.7 a.u., $\rho = 0.72$), in the presence of metastatic lesions in regional lymph nodes (11.6 ± 1.4 a.u., $\rho = 0.72$), the sum of Gleason scores greater than 7 (13.4 ± 1.2 a.u.), $\rho = 0.54$) and preoperative PSA level more than 10 ng / ml (11.1 ± 1.7 a.u., $\rho = 0.64$).

Given the data obtained on the relationship between the expression of LF and markers of CSC with clinical and pathological indicators associated with the aggressiveness of the tumour process, the recurrence-free survival of patients with PCa was analysed taking into account the expression of these markers. A significant reduction in two-year recurrence-free survival by 22% and 27% was found in patients with no LF expression and the presence of cells with the CSC phenotype in PCa tissue ($p < 0.05$).

Thus, the lack of LF expression and the presence of cells with the CSC phenotype in tumour tissue is associated with an unfavourable course of PCa, which according to clinical and pathological indicators has a high degree of malignancy.

In order to detect epigenetic disorders of regulation of LF and CSC expression, the peculiarities of miRNA-214 and -205 expression in tumour tissue and serum of 113 patients with Pca of the prospective group were estimated.

We found that the expression level of circulating and tumour-associated microRNAs-205 and -214 were significantly lower in patients with stage II PCa compared with patients of stage III and IV, in patients with category T2 compared with patients in category T3, in patients with metastases in regional lymph nodes compared with patients of category N0. Significantly higher levels of miRNA-205 and -214 were found in the serum and tumour cells of patients with $PSA > 10$ ng / ml than in patients with $PSA < 10$ ng / ml, as well as in patients with tumours of a Gleason score of > 7 against the corresponding rate of patients with tumours of Gleason scores < 7 .

Thus, we found that the expression level of circulating and tumour microRNA-205 and microRNA-214 directly correlates with such indicators of PCa

malignancy as stage ($\rho = 0.63$, $\rho = 0.55$; $p < 0.05$ and $\rho = 0.47$, $\rho = 0.52$; $p < 0.05$), the presence of metastases in regional lymph nodes ($\rho = 0.50$, $\rho = 0.63$; $p < 0.05$ and $\rho = 0.42$, $\rho = 0.56$), the sum of Gleason scores ($\rho = 0.39$, $\rho = 0.45$; $p < 0.05$ and $\rho = 0.44$, $\rho = 0.39$) and the level of PSA in serum ($\rho = 0.48$, $\rho = 0.52$; $p < 0.05$ and $\rho = 0.57$, $\rho = 0.37$).

Thus, as a result of a comprehensive study in the *in vitro* and *ex vivo* on the clinical material, molecular biological and epigenetic markers associated with the degree of malignancy of PCa were identified. The possibility of using LF expression indicators, CSC markers and tumour-associated miRNAs-205 and -214 for more detailed characterization of the tumour process in the prostate and as objective criteria for predicting the aggressiveness of PCa is substantiated. The identified correlations between the expression level of circulating miRNAs-205 and -214 with such indicators of PCa malignancy as the prevalence of the tumour process and the sum of Gleason scores indicate their potential use for minimally invasive monitoring of the tumour process.

Список публікацій здобувача

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.
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.
3. Zadvornyi 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.
4. ЗадворнийТ.В., БорікунТ.В., Лук'яноваН.Ю., ВітрукЮ.В., СтаховськийЕ.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.
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.
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.
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'є мужчини. - 2016. - № 4, С. 111-114.

8. Лук'янова Н.Ю., Борікун Т.В., Базась В.М., Яловенко Т.М., Задворний Т.В., Малишок Н.В., Россильна О.В. Циркулюючі мікроРНК: перспективи використання для ранньої діагностики та моніторингу перебігу пухлинного процесу // Онкологія. - 2019. - Т 21, № 3, С. 181-191.

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.

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.

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. – 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.Лукьянова, 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 дини // 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 РНК 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.

ЗМІСТ

РОЗДІЛ І ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	32
1.1. Генетичні зміни та їх значення у розвитку та прогресії РПЗ	35
1.2. Роль епігенетичної складової у патогенезі та формуванні ступеня злості РПЗ.	42
1.3. Протеомні маркери, асоційовані з агресивністю перебігу РПЗ	48
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	60
2.1 Характеристика клітин ліній РПЗ та умови їх культивування	60
2.2. Методи експериментального дослідження клітин ліній РПЗ	61
2.2.1. Цитоморфологічний метод дослідження	61
2.2.2. Імуноцитохімічний метод	62
2.2.3. Метод дослідження інвазивних властивостей злості трансформованих клітин <i>in vitro</i>	64
2.2.4. Метод дослідження експресії мікроРНК та її оцінка в злості трансформованих клітинах у системі <i>in vitro</i>	64
2.3. Клінічна характеристика хворих на РПЗ	68
2.3.1. Клінічна характеристика хворих на РПЗ проспективної групи	69
2.3.2. Клінічна характеристика хворих на РПЗ ретроспективної групи	70
2.4 Методи дослідження клінічного матеріалу	72
2.4.1. Морфологічне дослідження операційного матеріалу	72
2.4.2. Дослідження експресії молекулярних маркерів у пухлинній тканині хворих за допомогою імуногістохімічного методу	73
2.4.3. Дослідження експресії молекулярних маркерів, асоційованих з фенотипом ПСК в пухлинній тканині хворих на РПЗ за допомогою імуногістохімічного методу	75
2.4.4. Визначення експресії мРНК NANOG в тканині РПЗ	76
2.4.5. Визначення експресії мікроРНК в пухлинній тканині та сироватці крові пацієнтів з РПЗ	77

2.5. Метод біоінформатичного аналізу	78
2.6. Методи статистичної обробки одержаних результатів	78
РОЗДІЛ 3 ФЕНОТИПОВІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ОЗНАКИ	
КЛІТИННИХ ЛІНІЙ РПЗ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ.....	79
3.1. Цитоморфологічна характеристика клітинних ліній РПЗ людини	79
3.2.Фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ	
різного ступеня злоякісності	80
3.4 Особливості експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК у	
клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності	87
РОЗДІЛ 4. ЗВ'ЯЗОК ЕКСПРЕСІЇ ЛФ З КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИМИ	
ОСОБЛИВОСТЯМИ РПЗ ТА ПОКАЗНИКАМИ БЕЗРЕЦИДИВНОЇ	
ВИЖИВАНOSTІ ХВОРИХ	92
4.1.Топологія експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих на РПЗ.....	92
4.2. Кількісна оцінка експресії ЛФ в тканині РПЗ	97
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА КЛІНІЧНОГО ЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ МАРКЕРІВ	
ПСК ТА РІВНЯ мРНК NANOG У ПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ ДЛЯ	
ПРОГНОЗУВАННЯ АГРЕСИВНОСТІ ПЕРЕБІГУ РПЗ.....	103
5.1. Зв'язок між наявністю ПСК і рівнем мРНК NANOG у пухлинній	
тканині та клініко-патологічними особливостями РПЗ.....	103
5.2. Зв'язок рівня мРНК NANOG та маркерів ПСК з особливостями	
молекулярного профілю новоутворень РПЗ	110
РОЗДІЛ 6. ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ПУХЛИННИХ ТА	
ЦИРКУЛЮЮЧИХ мікроРНК-205 ТА -214, АСОЦІЙОВАНИХ ЗІ	
СТУПЕНЕМ ЗЛОЯКІСНОСТІ РПЗ.....	123
РОЗДІЛ 7 УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕННЯ.....	131
ВИСНОВКИ	144
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	147

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ALDH	-	aldehyde dehydrogenase - альдегід дегідрогеназа
AR	-	androgen receptor - рецептор андрогенів
ER α	-	estrogen receptor α - рецептор естрогену α
ER β	-	estrogen receptor β - рецептор естрогену β
GSTP1	-	glutathione S-transferase P1 - глутатіон-S-трансфераза P1
IGF	-	insulin-like growth factor - інсуліноподібний фактор росту
Her2/neu	-	human epidermal growth factor receptor 2 - рецептор епідермального фактора росту
hK2	-	human kallikrein 2 - людський калікреїн 2
lncRNA	-	long noncoding RNA - довгі некодуючі РНК
PCNA	-	proliferating cell nuclear antigen - ядерний антиген проліферуючих клітин
PHI	-	prostate health index - індекс здоров'я передміхурової залози
PR	-	progesterone receptor - рецептор прогестерону
SCNA	-	somatic copy number alterations - зміни кількості соматичні копій
5 α -ДГТ	-	5 α -дигідротестостерон
ДГПЗ	-	доброякісна гіперплазія передміхурової залози
ЗТ-ПЛР	-	зворотно транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція
ІЦХ	-	імуноцитохімічний аналіз
ЛФ	-	лактоферин
ПЗ	-	передміхурова залоза
ПІН	-	простатичних інтраепітеліальних неоплазій
ПЛР	-	кількісна полімеразна ланцюгова реакція
ПЛР	-	полімеразна ланцюгова реакція
ПМ	-	пухлинний маркер
ПСА	-	простатспецифічний антиген
ПСК	-	пухлинні стовбурові клітини

РЛВ	-	регіонарні лімфатичні вузли
РПЕ	-	радикальна простатектомія
РПЗ	-	рак передміхурової залози

ВСТУП

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 [1-4]. 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 [5-8].

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 ваговою 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 злоякісності захворювання приблизно в половині випадків, що ускладнює вибір адекватної терапії [9, 10]. 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 [11, 12]. З

огляду на це, пошук факторів, які б дозволити спрогнозувати агресивний потенціал з урахуванням біологічних особливостей пухлинних клітин, є пріоритетним напрямком досліджень.

Відомо, що виникнення і прогресія злоякісних новоутворень характеризуються порушенням системи мікроРНК-залежного посттранскрипційного контролю генів, залучених у підтримання клітинного гомеостазу [13-15]. МікроРНК регулюють велику кількість біологічних процесів, найважливішими з яких є проліферація, апоптоз і клітинний цикл [13, 16-18]. 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 [19-21].

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 [22-24]. Відомо, що у хворих на РПЗ рівень цього глікопротеїну знижується як у пухлинній тканині, так і в плазмі крові, при тому, що ПЗ є одним із найбільших ЛФ-продукуючих органів у осіб чоловічої статі [25-27]. Проте не з'ясованим залишається питання щодо прогностичного значення ЛФ у хворих на РПЗ.

Згідно з даними сучасної літератури [28-30], 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 [31-32].

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 металовмісних 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 гормонозалежних 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 (Е- 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. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана-Мейєра, 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 (РЛВ) 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 Тза 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 РЛВ ($\rho=0,50$; $\rho=0,63$ 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.

РОЗДІЛ І

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Згідно останніх даних статистики, РПЗ займає лідуючі позиції за показниками захворюваності та смертності в структурі онкологічних захворювань як в Україні так і в світі [1, 3]. Частота виявлення новоутворень зазначеної нозології неоднакова в різних країнах світу, в багатьох із них РПЗ посідає друге і третє місце після раку легені та шлунка [33]. Щорічно у світі діагностується понад 1,6 мільйонів нових випадків РПЗ та прослідковується чітка тенденція до збільшення кількості хворих на цю форму раку[34]. Згідно прогнозів Ferlay J.E.M.etal. кількість нових випадків РПЗ до 2040 р. збільшиться на 79,7% [1]. Відзначено тенденцію до омолодження контингенту хворих на РПЗ, хоча це захворювання все ще залишається онкологічною патологією чоловіків похилого і старечого віку, з найвищими показниками захворюваності серед чоловіків, починаючи з 50-річного віку з досягненням піку у віці 70–71 рік. За даними зарубіжних наукових досліджень [33] серед усіх чоловіків із РПЗ лише 0,1% становлять особи віком <50 років, а ризик захворіти у віці <40 років становить 1:10 тис. чоловічого населення.

Слід зазначити, що захворюваність на РПЗ в усьому світі варіює у широких межах [1]. Зокрема, найвищі показники відзначають в Австралії/Новій Зеландії та Північній Америці (111,6 і 97,2 на 100 тис. населення відповідно). Захворюваність на РПЗ залишається відносно високою і в інших менш розвинених регіонах: країнах Карибського басейну та Західної Африки (79,8; 61,8 на 100 тис. населення відповідно), при одночасно низьких її рівнях серед мешканців Південно-Східної та Південно-Західної Азії (10,5 та 4,5 на 100 тис. населення відповідно). У країнах Європи щорічно реєструють понад 85 тис. нових випадків РПЗ, що становить близько 11–12% усіх злویкісних новоутворень, на які хворіють чоловіки [33].

Недоліки в організації лікувально-діагностичного процесу істотно скорочують тривалість життя хворих на РПЗ, що особливо відчувається при порівнянні показників 5-річної виживаності пацієнтів [4]. Смертність від РПЗ має вищі рівні у країнах, де серед корінного населення переважає темношкіре (країни Карибського басейну — 29 на 100 тис. населення, Африка, особливо в області Сахари — 19–24 на 100 тис. населення), в протилежність цьому у країнах Азії визначаються найменші показники смертності від цієї онкологічної патології (2,9 на 100 тис. населення) [33].

В Україні у структурі злоякісних новоутворень чоловіків РПЗ посідає друге місце, випередивши навіть немеланомні злоякісні новоутворення шкіри. У 2017 р. в Україні зареєстровано 7495 нових випадків захворюваності на РПЗ [35]. Згідно даних Національного канцер-реєстру України грубий показник захворюваності на РПЗ за останні 10 років зріс у 1,5 рази: з 13,8 на 100 тис. населення у 2007 р. до 20,8 на 100 тис. населення у 2017 р. [35, 36]. Такий характер розвитку онкоепідеміологічного процесу в Україні свідчить про те, що в найближчі 10 років рівень захворюваності РПЗ зросте у 2 рази, а смертності – у 1,6 разів. Широке поширення РПЗ визначає його як важливу медико-соціальну проблему [37, 38].

На сучасному етапі етіологія РПЗ залишається одним із найактуальніших питань. Результати численних досліджень свідчать про зв'язок між виникненням РПЗ і порушенням ендокринної регуляції статевих гормонів (зокрема, тестостерону) за гіпоталамо-гіпофізарно-наднирково залозистим шляхом. До факторів ризику РПЗ відносять вік, расову та етнічну приналежність, спадковість, особливості харчування (зловживання жирами), надмірну масу тіла, наявність шкідливих звичок (тютюнопаління та ін.), низьку фізичну активність, екологічні фактори, зниження інтенсивності ультрафіолетового опромінення, наявність в анамнезі вазектомії, порушення балансу статевих гормонів, доброякісну гіперплазію ПЗ (ДГПЗ), тощо [33].

РПЗ є гетерогенним та мультифокальним захворюванням з різними клінічними та морфологічними характеристиками. Хоча РПЗ, як правило, є

індолентним захворюванням, у 25-30% випадків визначається агресивний перебіг пухлинного процесу. Вважається, що РПЗ виникає спочатку як андроген-залежна пухлина, яка в деяких випадках може перерости у високоінвазивне андроген-незалежне новоутворення. При прогресуванні РПЗ, пухлина поширюється локально, метастазує в тазові лімфатичні вузли та у віддалені органи, зокрема кістки. Під час канцерогенезу передміхурової залози відбуваються множинні клітинні та молекулярні події, в тому числі генетичні зміни [39].

Перебіг РПЗ варіює в широких межах і суттєво залежить від ступеня диференціювання пухлини на момент встановлення діагнозу. У пацієнтів з показником 8-10 балів за шкалою Глісона локальна пухлина досить швидко метастазує, що призводить до смерті хворого. У той же час у хворих з показником ≤ 6 балів за шкалою Глісона симптоматика захворювання взагалі буває відсутня, причому пухлина навіть може не прогресувати, і в результаті смерть хворого настане від інших причин, а не РПЗ. І дійсно, при аутопсії померлих чоловіків від різних причин, у віці 85 років і старших, майже в 75% випадків відзначають мікрокарциноми ПЗ [37]. Це свідчить про низьку діагностику початкових стадій РПЗ внаслідок його безсимптомності. Більше половини випадків цієї форми раку в Україні реєструється на пізніх стадіях, у зв'язку з чим понад 25% хворих помирають протягом першого року після встановлення діагнозу. Натомість у США від РПЗ протягом 5 років помирає лише 11% хворих [12].

Нещодавні дослідження підтвердили гетерогенність РПЗ на геномному, патоморфологічному та молекулярному рівнях. Незважаючи на досягнутий значний прогрес в дослідженні біології РПЗ протягом останнього десятиліття, до цього часу відсутня цілісна картина щодо ролі внутрішньо- та міжпухлинної гетерогенності у прогресуванні цієї форми раку [8].

Основними засобами боротьби з РПЗ є рання діагностика та ефективне лікування хвороби на її початкових стадіях. З огляду на це, одним з основних напрямків сучасних досліджень є пошук пухлинних маркерів, які б з високою

достовірністю дозволяли діагностувати виникнення пухлинного процесу ще до появи його клінічних проявів, особливо у пацієнтів із груп ризику. Пухлинні маркери – це молекули, які продукуються пухлинними клітинами або на рівні організму у відповідь на розвиток злоякісного новоутворення. Від молекул, що продукуються нормальними клітинами, вони відрізняються якісно (є пухлиноспецифічними) або кількісно (є пухлиноасоційованими, які продукуються також непухлинними клітинами, але в значно менших кількостях). Дослідження концентрації маркерних речовин на сьогодні розглядають як важливу складову діагностики при комплексному обстеженні пацієнтів з використанням клінічних, ендоскопічних, променевих та лабораторних методів [40].

1.1. Генетичні зміни та їх значення у розвитку та прогресії РПЗ

За останні роки численними експериментальними та клінічними дослідженнями показано, що труднощі діагностики, прогнозування перебігу та планування адекватного лікування хворих зі злоякісними новоутвореннями обумовлені різними клінічними проявами пухлинного процесу та відмінностями молекулярно-генетичних характеристик пухлин, зумовлених етіопатогенетичним різноманіттям неоплазій [7, 41]. Саме генетична нестабільність лежить в основі явища багаторівневої внутрішньопухлинної гетерогенності, і є ключовим фактором, що визначає спрямованість пухлинного процесу як на початку його виникнення, так і в реалізації різних форм пухлинної прогресії, тобто агресивності перебігу захворювання [7].

Завдяки використанню таких основних методів дослідження генетичної складової як клініко-генеалогічний, близнюковий, молекулярно-генетичний, а також сегрегаційного аналізу та картування генів було встановлено, що РПЗ має надзвичайно складну генетичну природу, включаючи соматичні зміни

кількості копій, точкові мутації, структурні перебудови та зміни кількості хромосом [42, 43]. Варто зазначити, що генетичні зміни, які відбуваються при канцерогенезі, можуть бути присутніми або в ДНК зародкової лінії, або в ізольованому геномі пухлини [43].

Станом на сьогодні, описано більше 20 хромосомних локусів, розташованих на 12 хромосомах (11 аутосомах та X-хромосомі), та величезну кількість змін в мітохондріальній ДНК, порушення в яких корелюють з РПЗ. В той же час, досі не виявлено жодного локуса на Y-хромосомі, який асоціюється з виникненням або прогресією цього захворювання [44]. Хромосомними локусами, які несуть мутації з високою пенетрантністю є 1p36, 1q24-q25, 1q42.4-q43, 8p22-23, 16q23, 17p11.2, 17p12-13, 19q13, 20q13, Xq27-q28 [45]. До відомих генів, які розташовані в деяких з перерахованих вище хромосомних локусів належать *RNASEL*, *ELAC2*, *MSR1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *HOXB13*, *CHEK2*, *NBN*, *BRIP1*, *ATM*, *EPCAM*, *MSH6*, *PALB2*, *RAD51D*, *TP53* [45, 46]. Крім того, в ході аналізу даних дослідження GWAS (*genome-wide association studies*) було виявлено, що локуси, пов'язані із ризиком розвитку РПЗ, часто знаходяться всередині генів або поблизу них та / або регулюють гени, які беруть участь у процесах онкогенезу, включаючи порушення клітинного циклу або репарації ДНК (*ATM*, *TERT*, *MYC* і *MDM2*), запальних реакцій (*IL8RB*, *TNF* і *LILRA3*) і метаболізму (*JAZF1* і *HNF1B*) [47, 48].

Як і інші злоякісні пухлини, РПЗ є високо гетерогенним захворюванням, що характеризується різними комбінаціями геномних змін (заміни основ, інсерції / делеції, транслокації, інверсії та зміни числа копій) на соматичному рівні, що ідентифіковані в різних пухлинах і навіть у різних клітинах однієї й тієї ж пухлини [49].

Зміни кількості соматичних копій (SCNA – Somatic copy number alterations) – це збільшення або втрата генетичного матеріалу, які впливають на більшу частку геному злоякісної клітини, ніж будь-яка інша форма соматичних генетичних змін. Вони відіграють провідну роль як в активації

онкогенів, так і в інактивації генів-супресорів пухлинного росту. SCNA виявляються майже у 90% пухлин ПЗ. На початкових стадіях пухлинного процесу, як правило, визначаються невеликі, вогнищеві зміни, тоді як при метастатичному ураженні – сотні аберацій, що відносяться до більшої частини геному. Зазначене свідчить, що прогресування РПЗ супроводжується збільшенням геномної нестабільності [43].

У первинних пухлинах ПЗ часто зустрічаються делеції на хромосомі 6q, 8p, 10q, 13q, включаючи такі гени як *NKX3-1*, *PTEN*, *BRCA2* і *RB1*. І навпаки, гормоно-резистентні метастазуючі пухлини характеризуються ампліфікацією хромосом X, 7, 8q і 9q і включають гени рецепторів андрогенів та онкогену *MYC*. Клінічна значимість SCNA була нівельована через труднощі у виявленні [43].

На сьогодні численні дослідження, виявили понад 100 множинних однонуклеотидних поліморфізмів (SNP – single-nucleotide polymorphisms), асоційованих з РПЗ у популяціях європейського та неєвропейського населення. Проте варто зазначити, що жоден із виявлених локусів не був ідентифікований як універсальний показник, що рекомендований для скринінгових досліджень [46].

Показано, що потенційними маркерами, асоційованими з несприятливим перебігом місцево поширеного РПЗ є гени *TWIST1*, *TUBB3* і *CHAT* [7], а також *NFKB1*, *VEGFA*, *HIF1* і *BCL2* [50]. Гіперекспресія зазначених генів визначається у пацієнтів з біохімічним рецидивом РПЗ. Варто зазначити, що для цієї групи хворих характерним також є зниження рівня експресії генів *CYP1B1*, *IGSF1*, *EDN3*, *MSMB* і *SERPINA3*. Біологічні процеси, в які залучені ці гени, включають розвиток і клітинне диференціювання (*TWIST1*, *EDN3*, *TUBB3*), нейрогенез (*TWIST1*, *EDN3*), регуляцію ангиогенезу (*CYP1B1*), розвитку мезенхіми (*TWIST1*, *EDN3*), гормонального фону (*CHAT*, *CYP1B1*), різних метаболічних шляхів (*CYP1B1*, *IGSF1*), формування клітинної відповіді на зовнішні стимули (*EDN3*, *TUBB3*, *CHAT*). Гени *CYP1B1*, *EDN3*, *TWIST1*, *TUBB3*, *CHAT* беруть участь в проліферації і міграції пухлинних

клітин, а тому можуть бути пов'язані з метастазуванням. Порушення регуляції сигнальних і метаболічних шляхів (*IGSF1*, *SERPINA3*, *MSMB*) є одним з найважливіших чинників при розвитку онкологічних захворювань, в тому числі РПЗ [7].

До генів схильності до РПЗ відноситься також ген *AR*, який розташований на хромосомі Xq11-12. Поліморфізм гена *AR* пов'язаний з числом тринуклеотидних повторів CAG в складі 1 екзона, яке може коливатися від 8 до 31. При збільшеній кількості CAG повторів (> 20), що кодують глутамінову кислоту, відбувається зменшення афінності рецептора до андрогенів. Навпаки, при меншій кількості повторів спорідненість до гормону збільшується і клітини ПЗ постійно піддаються дії гормонів, стимулюючих проліферацію, що збільшує ризик виникнення РПЗ [49].

Дослідження молекулярних характеристик пухлин ПЗ дозволили ідентифікувати кілька генів, порушення в яких зустрічаються в більшості новоутворень цього гістогенезу. Найбільшу специфічність щодо виникнення РПЗ має ген *NKX3.1*. Він розташований на хромосомі 8p21; його порушення спостерігаються в 90% карцином ПЗ і 60% простатичних інтраепітеліальних неоплазій (ПІН) цього органу. Функція гена *NKX3.1* полягає в регуляції транскрипції, причому однією з його мішеней є ген ПСА. Цікавим фактом участі *NKX3.1* в молекулярному патогенезі пухлин ПЗ є досить нетиповий механізм його інактивації. Встановлено, що втрата однієї з алелей *NKX3.1* майже ніколи не супроводжується пошкодженням копії гена, що залишилася [51].

HOXB13 – ген, який кодує протеїн, що зв'язується з *AR* і виступає в ролі чинника транскрипції, а також безпосередньо є модулятором транскрипції як андрогензалежних так і андрогеннезалежних ділянок геному [52]. Наявність мутацій в алелі G84E гена *HOXB13*, яка є у 0,1-0,6% європейського населення, пов'язують з підвищеним ризиком виникнення і одним з механізмів розвитку спадкового РПЗ. Показано наявність кореляційного зв'язку між експресією *HOXB13* та активністю *AR*, в той же час комплекс

HOXB13/AR негативно регулює активність гену ПСА. Комплекс HOXB13/AR також збільшує злиття генів *TMPRSS2* і *ERG*. Однак показано, що при мутації алеля G84E, навпаки, відбувається зниження експресії *ERG*, що обумовлено порушенням андрогенної стимуляції. Таким чином, ген *HOXB13* може бути незалежним прогностичним маркером при РПЗ [49].

Зародкові мутації гена *BRCA2* підвищують ризик розвитку РПЗ у чоловіків у віці до 65 років в 8,6 разів, а мутації гена *BRCA1* – в 3,4 рази. Зміни генів *BRCA2* і *BRCA1* виявлено в 1,2 і 0,44% випадках РПЗ відповідно. У носіїв зародкових мутацій в генах *BRCA1* / 2 РПЗ характеризувався більш агресивним перебігом. Виявлено позитивний зв'язок між наявністю мутацій в генах *BRCA1* / 2 і ступенем диференціювання РПЗ (показником Глісона ≥ 8), розміром новоутворень, ступенем регіонарного та віддаленого метастазування. Тривалість життя після лікування була вищою у пацієнтів без мутацій генів *BRCA1/2*, ніж у носіїв цих мутацій. Відзначається, що наявність мутацій гена *BRCA2* є більш критичною генетичною подією для розвитку РПЗ, ніж наявність мутацій в гені *BRCA1* [49].

Ще одним досить перспективним прогностичним маркером РПЗ може бути *NANOG*, який кодує однойменний транскрипційний фактор, ідентифікований Chambers I. та співавторами у 2003 р. [53, 54]. Встановлено, що *NANOG* залучений в регуляцію та функціонування десятків генів, забезпечуючи самооновлення та підтримання плюрипотентності в недиференційованих клітинах, зокрема в ембріональних стовбурових клітинах [55].

У людини, крім гену *NANOG* також ідентифіковано 11 псевдогенів *NANOG* (від *NANOGP1* до *NANOGP11*), послідовності яких більш ніж на 90% ідентичні гену *NANOG*. У псевдогенів відсутні інтрон-екзоніві повтори, а також вони відрізняються від *NANOG* структурою власних промоторів. *NANOG* діє спряжено із транскрипційними факторами Sox2, Oct3/4 (POU5F1), FoxD3 та здатний активувати їх експресію. Регуляція експресії

NANOG здійснюється за участі мікроРНК-214 та мікроРНК-21, що опосередковують свою дію через p53 [56-58].

Вважається, що *NANOG* відіграє провідну роль в канцерогенезі і прогресії деяких злоякісних новоутворень. Він експресується в ембріональних гоноцитах, клітинах раку яєчка *in situ*, семіноми, ембріонального раку і карциноми молочної залози. Крім того, підвищена експресія *NANOG* в пухлинних клітинах корелює з несприятливим клінічним перебігом злоякісних новоутворень [59].

У нещодавніх дослідженнях на моделях *in vitro* продемонстровано наявність експресії *NANOG* в клітинах ліній РПЗ. Jeter C.R. et al., встановили, що експресія білків, які кодуються геном *NANOG* і псевдогеном *NANOGp8* в клітинах ліній РПЗ людини асоціюється з наявністю ПСК та корелює з такими показниками злоякісності, як здатність до самооновлення та колонієутворююча активність. Зокрема, гіперекспресія *NANOG* як в андроген-чутливих, так і в андроген-рефрактерних клітинах ліній РПЗ сприяє утворенню та росту пухлин при перищепленні їх тваринам [60]. Нещодавно було показано що гіперекспресія *NANOG* асоціюється з підвищенням рівня BCL-2, IGFBP-5 і CXCR4, що робить клітини нечутливими до андрогенової депривації [61]. В той же час значення *NANOG* у прогнозуванні перебігу РПЗ залишається маловивченим і до кінця не з'ясованим.

На відміну від більшості інших солідних пухлин, у тканині РПЗ часто визначаються химерні (гібридні) гени, що виникають у результаті хромосомних перебудов (транслокацій, інтерстеціальних делецій і інверсій). Загальна риса химерних генів – комбінація 5'-промоторної області андроген-регулюючого гена (*TMPRSS2*, *SLC45A3*, *KLK2*, *ACSL2*) і 3'-кодуючої області одного з транскрипційних факторів (*ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5*). Ці потенційно онкогенні транскрипційні фактори «мовчать» в нормальних епітеліальних клітинах ПЗ, але химерні гени викликають їх андроген-індуковану гіперекспресію. Виникнення химерного онкогена є ранньою генетичною подією, тригером онкогенного процесу в ПЗ [49].

Одним з перспективних маркерів для прогнозування перебігу злоякісних новоутворень є *ERG*, який відповідає за регуляцію ембріонального розвитку, клітинну проліферацію, диференціювання, ангіогенез, запалення і апоптоз. Встановлено, що в 42% випадків РПЗ та у 20% випадків інтраепітеліальної неоплазії ПЗ відбувається його злиття з геном *TMPRSS2*. *TMPRSS2* – андроген-регульована трансмембранна серинова протеаза II типу, яка експресується в тканині ПЗ. Прогресування пухлинного процесу відбувається шляхом втрати промотора алелі *TMPRSS2* з приєднанням його до однієї з алелей *ERG*, що призводить до гіперекспресії членів сімейства транскрипції ETS в злоякісно трансформованих клітинах і викликає прогресування захворювання. Вперше перебудови між генами *TMPRSS2* і *ERG* / *ETV1* були виявлені при онкогематологічних захворюваннях. Встановлено, що наявність злиття *TMPRSS2:ERG* асоціюється з високим ступенем злоякістості новоутворень, агресивним перебігом пухлинного процесу та зниженням у 3 рази показників виживаності хворих [62, 63].

Пухлинна прогресія залежить не тільки від молекулярних змін епітеліальних клітин, а й від численних змін строми, що забезпечує необхідне мікрооточення для проліферації, міграції та інвазії. Накопичення численних генетичних порушень характерне не тільки для злоякісно трансформованих клітин, але і для асоційованих з пухлиною фібробластів. Молекулярні пошкодження геному стромальних клітин, такі як гіперметилування генів-супресорів, делеції і мікросателітна нестабільність, мутації мають свій особливий профіль. При РПЗ найбільша частота делецій в пухлинних клітинах виявлена в районі 16q23 (72%), а в стромі – в районі 13q14 (58%). При доброякісних пухлинах максимальна частота делецій в клітинах епітелію і строми знайдена для локусу 13q14. Частота алельних перебудов в злоякісно трансформованих клітинах зростає зі збільшенням стадії РПЗ, а в стромі практично не змінюється або зменшується в під час пухлинної прогресії. Виявлений статистично достовірний зв'язок алельних

втрата в епітелії на 16-й хромосомі зі ступенем диференціювання пухлини, стадією пухлинного процесу і наявністю метастазів в РЛВ [64].

1.2. Роль епігенетичної складової у патогенезі та формуванні ступеня злоякісності РПЗ.

При злоякісних захворюваннях ПЗ одними з найбільш значущих подій на молекулярному рівні є епігенетичні зміни [45, 65]. Вони включають в себе три окремих взаємопідсилюючих механізми: зміни метилювання ДНК; посттрансляційні модифікації гістонів і ремоделювання хроматину; експресію некодуючих РНК [66]. Детально досліджено участь епігенетичних факторів в регуляції різних клітинних процесів, включаючи проліферацію, репарацію «фонових» ушкоджень геномної ДНК, апоптоз і міжклітинну взаємодію [65].

Метилювання ДНК є найпоширенішим і детально охарактеризованим епігенетичним явищем при пухлинному рості, включаючи РПЗ [67]. У злоякісно трансформованих клітинах людини було продемонстровано два типи змін метилювання ДНК. Перший стосується глобального гіпометилювання, коли в геномі пухлинних клітин спостерігається зниження метилювання порівняно з нормальними клітинами. Це гіпометилювання зумовлене насамперед втратою метилювання в повторюваних елементах геному, що призводить до геномної нестабільності. Другий тип зміни метилювання в пухлинних клітинах – це метилювання CpG островців, що лежать у промоторних областях супресора пухлини та інших регуляторних генів, які зазвичай не метильовані. Промоторні ділянки цих генів інактивуються шляхом метилювання. Це називається гіперметилюванням генів [67].

Зміни в метилюванні ДНК часто відбуваються спільно зі змінами структури хроматину, модульованою модифікацією гістонів, інгібуванням

експресії гена. Крім того, метилювання поблизу промоторних сайтів може працювати безпосередньо на інгібування зв'язування факторів транскрипції з їх розпізнавальними послідовностями [67].

При РПЗ було виявлено велику кількість гіперметилюваних генів, наявність яких корелює зі ступенем злоякісності та клініко-патологічними характеристиками новоутворень. Зазначені гени беруть участь у регуляції таких процесів як репарація ДНК (Глутатіон S Трансфераза P1; O⁶-Метилгуанін-ДНК-Метилтрансфераза), сигнальна трансдукція (RASSF1A), міжклітинна адгезія (ендотелінові рецептори, E-кадгерин, CD44, Adenomatous Polyposis Coli gene та галектини), гормональна відповідь (рецептор ретиноевої кислоти; AR та ER α), апоптоз (Dasth-кіназа), інвазія та метастазування (тканинні інгібітори металопротеїназ і галектини), а також здійснюють контроль клітинного циклу (цикліни, циклінозалежні кінази та їх інгібітори). Схематичне зображення гіперметилювання генів при розвитку та прогресії РПЗ наведено на рис 1.2.1 [67].

Гіперметилювання послідовностей, що регулюють транскрипцію гена глутатіон-S-трансферази P1 (*GSTP1*), виявляється більш ніж в 90% зразків РПЗ, що значно перевищує частоту виявлення відомих дефектів соматичних генів. Перші повідомлення про це з'явилися ще в 1994 р. Однак причини гіперметилювання регуляторних послідовностей гена *GSTP1* при РПЗ остаточно не відомі. Зміни функції глутатіон-S-трансферази фіксують на 5-10% ділянках, пошкоджених в результаті так званої проліферативної-запальної атрофії, яка розглядається як найбільш ранній передраковий стан. При інтраепітеліальній неоплазії ПЗ активність глутатіон-S-трансферази відсутня вже більш ніж в 70% пошкоджених ділянок. Крім гена *GSTP1*, виявлено ще близько 40 генів, експресія яких блокується шляхом епігенетичної регуляції при РПЗ. Гіперметилювання *GSTP1*, *APC*, *RASSF1a*, *COX2* і *MDR1* реєструється як на ранніх стадіях РПЗ, так і при його прогресії. Гіперметилювання інших генів (*ER α* , *hMLH1*, *p14 / INK4a*) виявляється, як правило, тільки на пізніх стадіях пухлинного процесу. Гени, які частіше за

інших гіперметильовані при РПЗ: *GSTP1*, *RARB*, *CD44*, *RASSF1*, *MGMT*, *AR*, *ESR1,2*, *APS*, *DAB21P*. Продукти генів *GSTP1* (глутатіон-S-трансфераза) і *MGMT* (метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза) беруть участь у репарації ДНК, гени *RARB*, *AR*, *ESR1,2* пов'язані з регуляцією гормональної відповіді, а гени *CD44*, *APS* - з метастатичним потенціалом пухлини [68].

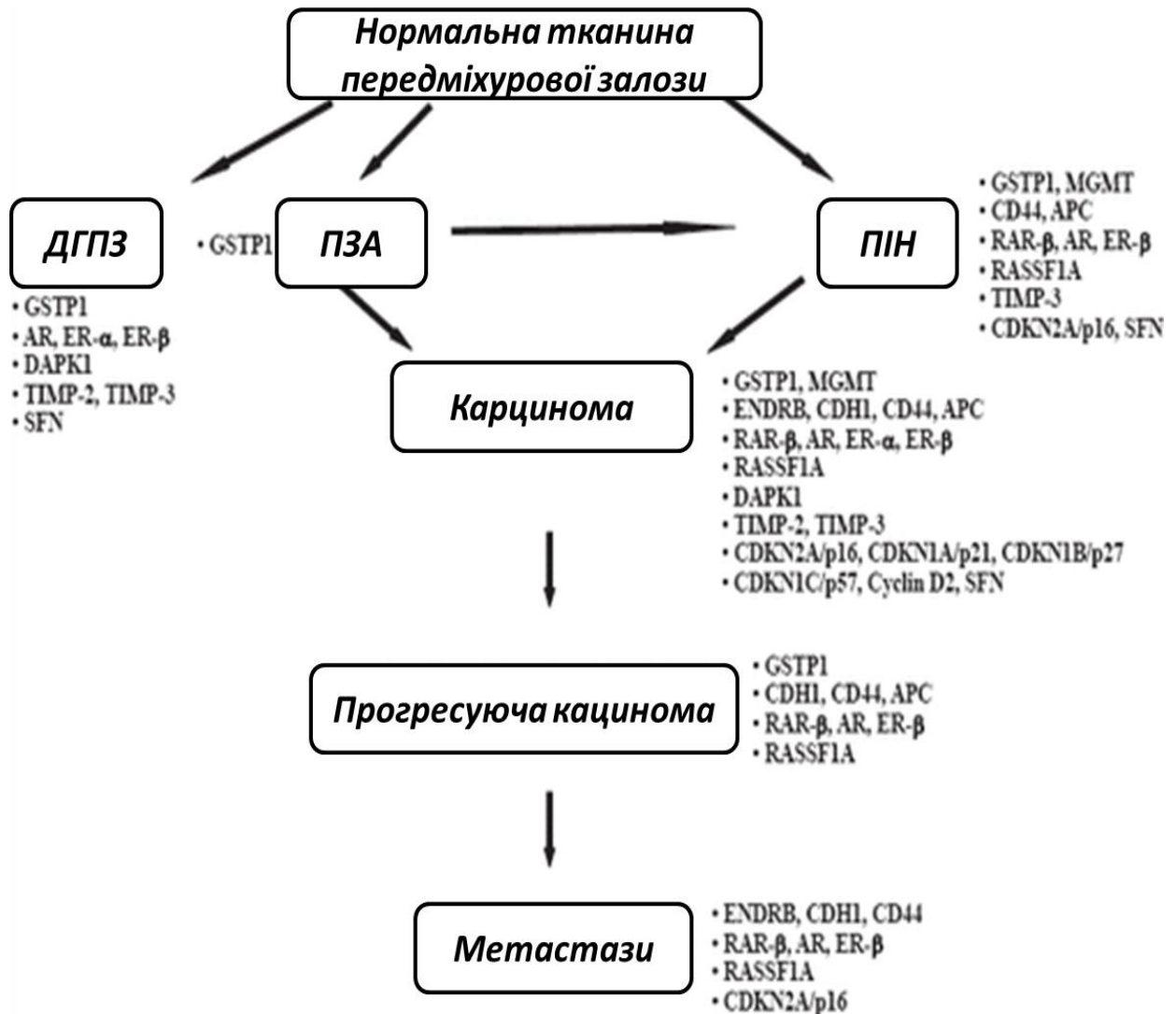


Рис.1.2.1. - Гіперметилування генів на різних стадіях розвитку та прогресії РПЗ [67].

Примітка. ПЗА - проліферативна запальна атрофія

Ацетилювання і деацетилювання гістонів відбувається за участю гістонових ацетилтрансфераз і деацетилаз (НАТ і HDAC). Ацетилювання гістонів забезпечує транскрипційну активність генів. Навпаки, видалення

ацетильної групи призводить до конденсації хроматину і припинення транскрипції гена. Обробка клітин РПЗ інгібіторами деацетилаз призводить до підвищення експресії генів, таких як ген карбоксипептидази А3 (CPA3) і ген білка-3, що зв'язує інсуліноподібний фактор росту (IGFBP-3). У тканині РПЗ ідентифікується гіперекспресія гістонових деацетилаз 1, 2 і 3, особливо при новоутвореннях, резистентних до гормонотерапії [68].

Довгі некодуючі РНК (long noncoding RNA, lncRNA) – важлива група не кодуючих РНК довжиною від декількох сотень до декількох тисяч нуклеотидів. Генетичні зміни і аберантна експресія деяких lncRNA може бути одним із факторів розвитку онкологічної патології. Висока експресія HOTAIR є характерною ознакою тканини РПЗ і корелює з несприятливим перебігом пухлинного процесу [69]. В якості нового прогностичного біомаркера і терапевтичної мішені при РПЗ вже використовують lncRNA LOC400891. HCG11 (HLA complex group 11, non-protein coding) – андроген-чутлива lncRNA, експресія якої пригнічена при РПЗ, особливо у новоутвореннях з індексом Глісона ≥ 8 . Зниження рівня експресії HCG11 корелює з віком, статусом лімфатичних вузлів і передопераційним рівнем ПСА, але не пов'язано зі стадією пухлинного процесу. Високий рівень HCG11 корелює з тривалістю безрецидивного періоду при РПЗ. Багатофакторний аналіз показав, що рівень експресії HCG11 і індекс Глісона – незалежні прогностичні фактори, асоційовані із виникненням рецидиву захворювання. Таким чином, HCG11 – чутливий і специфічний біомаркер для прогнозування агресивності РПЗ і потенційна терапевтична мішень [49].

Новими об'єктами пошуку біомаркерів РПЗ є мікроРНК — це малі некодуючі РНК довжиною приблизно 22 нуклеотиди, які регулюють рівень експресії матричних РНК (мРНК) шляхом взаємодії (інтерференції) з їх специфічними регіонами. МікроРНК забезпечують деградацію мРНК і, таким чином, знижують рівень експресії таргетних білків завдяки зв'язуванню з 3'-некодуючим регіоном мРНК [21, 70]. Володіючи рядом переваг, мікроРНК можуть виступати в якості повноцінних діагностичних і прогностичних

біомаркерів РПЗ, а висока стабільність і тканинна пухлинна специфічність роблять їх привабливими для дослідження.

На сьогодні відомо, що при розвитку РПЗ відбувається зміна рівня експресії принаймні 75 мікроРНК, при цьому порушення експресії 22 мікроРНК визначаються у зразках гормон-рефрактерного РПЗ порівняно з чутливими до гормональної терапії пухлинами. Наведені дані свідчать, що зміна експресії мікроРНК є одним з механізмів резистентності до андрогенної терапії. Специфічні мікроРНК можуть діяти як супресори пухлин (tumor suppressor miR, ts-miR) або як онкогени; при канцерогенезі рівні ts-miR знижені, а рівні онкогенних мікроРНК підвищені. Найбільш перспективні мікроРНК, що можуть використовуватись для прогнозування перебігу РПЗ представлені в Табл. 1.2.1.

Підвищення рівня онкогенних мікроРНК ідентифікується у клітинах ліній РПЗ, зокрема мікроРНК -21, -221, -222, -291, а також кластер мікроРНК-17-92, який складається з 6 членів: мікроРНК -17, -18a, -19a, -20a, -19b-1 і -92a-1. Мішенями дії зазначених онкогенних мікроРНК є гени *PTEN*, *BIM*, *RB1* та білки p21 і p27. Встановлено, що у клітинах РПЗ відзначається пригнічення експресії кластера ts- мікроРНК-15a / 16-1, мішенню якого є гени *BCL2* (негативний регулятор апоптозу) і *CCND1* (позитивний регулятор проліферації). Гіперекспресія цих мікроРНК може призводити до інгібування проліферації та індукції апоптозу [71, 49]. Зокрема, мікроРНК-34a пригнічує експресію гена *AR*. Низький рівень експресії мікроРНК-34b в зразках РПЗ визначається у новоутвореннях низького ступеня диференціювання з показниками Глісона 8-10, в той час як гіперекспресія зазначеної мікроРНК корелює з високими показниками виживаності хворих [49].

Виявлено, що підвищення рівнів мікроРНК -21, -141, -121 асоціюється зі збільшенням стадії пухлинного процесу у хворих на РПЗ [72]. Іншими дослідниками з використанням мікрочіпування ідентифіковано 15 мікроРНК, рівні яких підвищені при РПЗ [73]. Поряд з цим, встановлено, що виникнення РПЗ супроводжується зміною співвідношення 12 циркулюючих мікроРНК,

11 з яких значно підвищені при наявності метастазів порівнянно з локалізованою формою РПЗ, особливо мікроРНК-141 і мікроРНК-375 [74].

Таблиця 1.2.1.

МікроРНК, асоційовані з агресивністю перебігу РПЗ

Клінічний матеріал	Мікрорнк	Значення	Джерело
Пухлинна тканина	мікроРНК-34↓182↑	Збільшення стадії пухлинного процесу	Tsuchiyama, K., et al. (2013) [76].
	мікроРНК-182↑	Ризик виникнення метастазів, низька виживаність	Casanova-Salas, I., et al. (2014) [77].
Сироватка крові	мікроРНК-21↑, мікроРНК-221↑	Агресивний перебіг РПЗ та наявністю метастазів	Agaoglu, F. Y., et al. (2011) [72].
	мікроРНК-200b↑	Наявність метастазів в РЛВ	Bryant, R., et al. (2012) [74].
	мікроРНК-126↑, мікроРНК-21↑, мікроРНК-200b↑	Визначення ступеня злоякості РПЗ	Watahiki, A., et al. (2013) [78].
	мікроРНК-21↑	Чутливість до гомональної терапії	Zhang, H. L., et al. (2011) [79].

Інше дослідження виявило панель з 5 мікроРНК, які дозволяють з високою точністю відрізнити РПЗ від ДГПЗ [75].

Встановлено, що рівень мікроРНК -16, -195 і -26а корелює з підвищеною частотою позитивного хірургічного краю, а рівень мікроРНК -195 і мікроРНК -let7i – з індексом Глісона [80]. При збільшенні кількості балів за шкалою CAPRA ввідзначається зменшення рівня мікроРНК -24 і підвищення мікроРНК-106а, мікроРНК -451, мікроРНК -20а, мікроРНК-21 і мікроРНК-93 [81]. Згідно даних деяких клінічних спостережень показники експресії мікроРНК можуть бути використані в якості предиктивних факторів для визначення чутливості до медикаментозної терапії РПЗ. Зокрема, високі показники циркулюючої мікроРНК-21 спостерігаються у пацієнтів з кастраційно-резистентним РПЗ і корелюють з чутливістю пухлин до доцетакселу [79]. Рівень мікроРНК-141 дозволяє з високою чутливістю та специфічністю 78,9 % і 87,4 % визначати ризик прогресування РПЗ [82].

1.3. Протеомні маркери, асоційовані з агресивністю перебігу РПЗ

Відомо, що абсолютна більшість патологічних змін у функціонуванні клітин, тканин і органів супроводжується відхиленням від фізіологічного білкового профілю нормального здорового організму. В сучасних умовах аналіз і прогнозування подібних змін виходять на перший план при створенні протоколів доклінічного скринінгу. Пошук, визначення, виділення, кількісне і якісне визначення білкових молекул, що відіграють роль в забезпеченні чутливості або безпосередньо у формуванні захворювання, є основними завданнями протеоміки [83]. Відомі на сьогодні прогностичні маркери РПЗ можна розділити на маркери сироватки периферичної крові і пухлинні (Табл. 1.3.1). Суттєвою перевагою першої групи маркерів є їх мала інвазивність, адже для дослідження достатньо отримати зразки крові хворого (або інших біологічних рідин) за допомогою рутинних методів, тоді як для аналізу пухлинних маркерів необхідним є проведення біопсії або радикальної простатектомії (РПЕ). Значною перевагою маркерів сироватки крові є можливість проведення скринінгу здорових людей і формування груп ризику, моніторингу стану організму хворих після проведеної терапії, а також виявлення пухлинного процесу на ранніх стадіях.

Скринінг, заснований на тестуванні біологічних рідин, дуже привабливий через мінімальну інвазивність, швидкість і дешевизну процедури збору клінічних зразків. Біологічні рідини не тільки зручні, але і фактично являють собою важливе джерело маркерів пухлинного росту, бо трансформовані клітини можуть продукувати і вивільняти ці молекули. Сеча та секрет ПЗ сьогодні широко вивчаються разом з сироваткою/плазмою крові для ідентифікації біомаркерів РПЗ [84-86].

Протягом останніх 20 років клініцисти сконцентрували свою увагу на використанні ПСА, який на сьогоднішній день є основним маркером, що використовується для скринінгу та моніторингу РПЗ [9, 87, 88]. ПСА був

відкритий М. Wang et al. у 1979 р. (виділений з екстракту ПЗ) [12, 89]. Встановлено, що ПСА є одноланцюговим глікопротеїном з молекулярною масою 34 kDa, який синтезується епітелієм ПЗ і, потрапляючи у сім'яну рідину, забезпечує розрідження еякуляту і збільшення рухливості сперматозоїдів. ПСА існує в трьох основних формах: зв'язаний з $\alpha 1$ -антихімотрипсином, зв'язаний з $\alpha 2$ -макроглобуліном та у вільному, незв'язаному стані [90]. Вільні форми ПСА становлять 5-55% від загального ПСА; комплексні зв'язані форми: ПСА- $\alpha 1$ -антихімотрипсин — 60-95% загального ПСА; ПСА- $\alpha 1$ -макроглобулін — 1-2% загального ПСА [87]. Починаючи з 80-х років минулого століття в Західній Європі, США, Канаді визначення ПСА при обстеженні чоловіків стало обов'язковим. У цих країнах впроваджена скринінгова система виявлення РПЗ: чоловіки у віці 50 років і більше регулярно проходять обстеження з визначенням рівня ПСА у сироватці крові [12].

Характерно, що за умови обтяженого ракового сімейного анамнезу, чоловікам після 35-40 років рекомендується регулярно проводити скринінг. Визначення ПСА при скринінгу РПЗ збільшило кількість виявлених випадків локалізованого пухлинного процесу приблизно вдвічі: до використання ПСА кількість локалізованих форм РПЗ серед вперше виявлених становила 33 %, а в даний час в економічно розвинених країнах світу цей показник збільшився у два рази і дорівнює 60-70 % [12]. На сьогодні ПСА використовується з метою диференційної діагностики злоякісних і доброякісних пухлин ПЗ, оцінки стадії захворювання, скринінгу або для раннього виявлення РПЗ, моніторингу перебігу і прогнозу пухлинного процесу.

Таблиця 1.3.1

Основні пухлинні та сироваткові маркери РПЗ

Маркер	Біологічна функція	Значимість	Клінічний матеріал	Автори
ПСА	Протеолітичний фермент	Диференційна діагностика РПЗ та ДГПЗ Скринінг/раннє виявлення РПЗ, Визначення стадії захворювання; Моніторинг та прогноз перебігу РПЗ	Сироватка крові	M Wang et al. (1979) [91] AR Rao et al. (2008) [89]
hK2	фермент класу гідролаз, який каталізує перетворення кініногенів в кініні	Підвищена експресія при РПЗ порівняно з ДГПЗ, більш чутливий, ніж ПСА при виявленні екстракапсулярного росту	Сироватка крові	Черняев В.А. (2011) [92]
Гепсидин	Регуляція обміну заліза	Високі рівні у хворих на РПЗ з метастатичним ураженням кісток	Сироватка крові	TesfayL. et al. (2015) [93]
Е-кадгерин	Залучений в механізми регулювання міжклітинної адгезії, клітинної рухливості і проліферації епітеліальних клітин	Низька експресія у пухлинах вказує на наявність метастазів у РЛВ	Пухлинна тканина	Фомкин Р.Н., и др. (2013) [94]
Пухлиноасоційований інгібітор трипсину	Регуляція реакцій протеолізу в клітині	Експресія пов'язана з агресивністю пухлинного росту та високим інвазивним потенціалом новоутворень	Пухлинна тканина	Bjartell A., et al. (2011) [95] Paju A., et al. (2007) [96]
IGF	Посилення проліферації епітеліальних клітин ПЗ регуляція апоптозу епітеліальних клітин ПЗ	Високий рівень експресії може вказувати на високий бал градації пухлинної тканини за Гліссоном.	Пухлинна тканина	Повелица Э.А. и др., (2009). [97]
PCNA	Кофактор ДНК-полімерази	Високий рівень експресії при РПЗ. Експресія корелює зі стадією пухлинного процесу	Пухлинна тканина	Nemoto, R. et al. (1993)[98] Limas, C. et al. (1994) [99]

Відомі також інші біологічні маркери пухлинного процесу: калікреїн 2 людини, який більш чутливий порівняно з ПСА при виявленні екстракапсулярного росту; інсуліноподібний фактор росту (IGF), асоційований з посиленням проліферації епітеліальних клітин ПЗ та регуляцією апоптозу епітеліальних клітин ПЗ; фактор росту ендотелію судин, який регулює диференціювання клітин ендотелію, їх міграцію, проліферацію і утворення судин; церулоплазмін, який є каталізатором при окисленні заліза, та має антиоксидантні та протизапальні функції, а також розчинний рецептор трансферину та гепсидин.

Важливою характеристикою такого маркера як ПСА є оцінка радикальності хірургічного втручання у хворих на РПЗ. Після РПЕ його рівень повинен знизитися до «біологічної межі визначення» і становити менше 0,1 нг/мл. У таких хворих рекомендують далі оцінювати рівень загального ПСА через 90 днів після операції, потім – через кожні 3 місяці протягом першого року, а в наступні три роки — через кожні 6 місяців і далі — щорічно. Виявлення біохімічних рецидивів РПЗ після РПЕ ґрунтується на показнику швидкості зміни рівнів ПСА в часі: 2 послідовних підвищення маркера з перервою в 1 місяць свідчать про початок розвитку рецидиву. Свідченням появи рецидиву після променевої терапії вважається підвищення рівня ПСА більш ніж на 0,2 нг/мл порівняно з мінімальними значеннями, досягнутими після лікування [100].

Відомо, що концентрація ПСА в сироватці крові підвищується і при інших захворюваннях ПЗ – при ДГПЗ, простатиті, ішемії або інфаркті ПЗ, гострій затримці сечі, еякуляції напередодні дослідження. Таким чином, рівень ПСА у сироватці характеризується органоспецифічністю, але не канцероспецифічністю. Його помірне підвищення не завжди свідчить про наявність злоякісного процесу, а тому він не може бути рекомендований до використання в якості самостійного метода для диференційної діагностики локалізованого РПЗ та ДГПЗ [12, 101].

В лабораторній діагностиці РПЗ, окрім визначення рівня ПСА у сироватці периферичної крові, все більшого значення набувають також такі показники як щільність ПСА, відношення вільного ПСА до загального ПСА, швидкість збільшення рівня ПСА протягом року. Інший тест, який використовується для діагностики РПЗ і все частіше обговорюється в науковій літературі – це аналіз вмісту proПСА і, зокрема, [-2]proПСА, який є незрілою формою ПСА або його попередником. Цей показник є формою вільного ПСА і в більшій мірі корелює з РПЗ, тоді як інший тип вільного ПСА – bПСА, або доброякісний ПСА, корелює зДГПЗ [102].

Слід відзначити, що специфічність [-2]proПСА вища, ніж специфічність вільного і зв'язаного ПСА при показниках загального ПСА від 2 до 10 нг/мл. Використання тесту на [-2]pro ПСА підвищує точність діагностики РПЗ при значенні загального ПСА від 2 до 10 нг/мл. Рівень [-2]pro ПСА корелює також зі ступенем агресивності РПЗ. Профермент [-2]pro ПСА розглядається в якості нового маркера для раннього виявлення РПЗ, оскільки його рівні корелюють зі стадією і розміром пухлини. В подальшому на основі вимірів загального і вільного ПСА і [-2]proПСА були запропоновані два розрахункових параметра: % [-2]proПСА і «індекс здоров'я простати» (РНІ), значимість яких для уточнюючої діагностики ПСА була продемонстрована у дослідженні [102].

Показник РНІ розраховується на підставі результатів визначення загального ПСА, вільного ПСА і [-2]proПСА. За даними ряду публікацій прогностичне значення РНІ в диференційній діагностиці доброякісних та злоякісних новоутворень ПЗ у чоловіків старших 50 років достовірно вище, ніж при використанні показника загального ПСА, або співвідношення вільного ПСА до загального ПСА. Показано, що на підставі визначення [-2]proПСА і показника РНІ значно поліпшується прогностичне значення, чутливість та специфічність цих тестів в порівнянні із загальним та вільним ПСА. Використання вищезазначених похідних ПСА покращує специфічність ПСА-тесту при його значеннях від 4 до 10 нг/мл, а також може виявитися корисним для дослідження нових можливих біомаркерів РПЗ [102].

До найбільш перспективних білкових біомаркерів для діагностики і прогнозу РПЗ належить людський калікреїн 2 (hK2). Цей білок тісно пов'язаний з ПСА і дозволяє передбачити ймовірність наявності РПЗ у пацієнтів з підвищеним рівнем ПСА [92]. Були опубліковані попередні результати дослідження ефективності тесту 4Kscore, який заснований на визначенні hK2, загального, вільного і інтактного ПСА з урахуванням віку хворих та результатів пальцевого ректального обстеження. При запропонованому пороговому рівні тест виявився здатним зменшити кількість біопсій на 41 % і дозволяв адекватно прогнозувати перебіг пухлинного процесу у 97 % випадків [103].

Оскільки ПЗ – гормоночутливий орган, важливою також є оцінка рівнів експресії AR у пухлинних клітинах для прогнозування їх чутливості до гормонотерапії. Доведено, що рецептори андрогенів можуть взаємодіяти з різними регуляторними системами клітини. Зокрема, є дані щодо їх синергізму з білком Her-2/neu [104] та рядом інших протеїнів [105]. Показники експресії AR пов'язані з проліферативною активністю новоутворень і тривалістю загальної та безрецидивної виживаності хворих [106]. В той же час, при обстеженні хворих може бути недостатньо лише імуногістохімічного визначення цього білка, адже пухлинні клітини можуть нести генетичні порушення, які впливають на експресію гена, що його кодує, зокрема точкові мутації та збільшення кількості його копій.

Вважається, що втрата міжклітинних контактів і зв'язку з сусідніми епітеліальними клітинами є одним з перших етапів розвитку пухлинного процесу. За даними різних дослідників, знижена експресія E-кадгерину часто спостерігається у клітинах РПЗ. Крім того, показано, що рівень експресії цього білка обернено корелює із прогресією захворювання, стадією пухлинного процесу та виживаністю хворих [107, 108]. Зокрема, зниження рівня цього білка ідентифікується у пухлинах з високим ступенем злоякісності і за умови високих концентрацій ПСА у сироватці крові хворих. В той же час, зв'язок експресії E-кадгерину зі ступенем метастатичного ураження РПЗ, на відміну від даних,

щодо пухлин інших локалізацій, лишається недостатньо вивченим. Деякі дослідники вказували на достовірне зниження експресії цього мембранного білка у пухлинах з регіонарними та віддаленими метастазами, тоді як інші не виявили достовірних змін [108]. Таким чином, визначення експресії E-кадгерину може бути корисним як для виявлення трансформованих клітин РПЗ, так і для прогнозу перебігу захворювання і оцінки виживаності хворих.

Важливу роль для оцінки особливостей пухлинного процесу відіграє визначення проліферативної активності клітин РПЗ та експресії білків-регуляторів апоптозу. Класичним маркером проліферативної активності є ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) – кофактор ДНК-полімерази, максимальні рівні експресії якого спостерігаються у S-фазі клітинного циклу [98, 109]. Показано, що рівень експресії PCNA найнижчий у нетрансформованому епітелії ПЗ, середній – у високодиференційованих пухлинах РПЗ і максимальний при недиференційованому інвазивному РПЗ, хоча дослідники відмічають сильну варіабельність отриманих результатів. Крім того, відмічено сильний кореляційний зв'язок між експресією PCNA та стадією РПЗ [99], що може бути використане для прогнозування перебігу пухлинного процесу [110].

Інший класичний маркер проліферації – Ki-67, ядерний антиген, який експресується у G1-, S-, G2-, та M-фазах клітинного циклу і відсутній у клітинах, які перебувають у стані спокою (G0). Оскільки оригінальні антитіла до білка Ki-67 демонстрували незадовільну імунореактивність при дослідженні тканин, фіксованих у парафіні, були розроблені антитіла MIB-1, специфічні до рекомбінантних частин антигену Ki-67 [111, 112]. За даними досліджень пухлин у хворих на РПЗ, високий проліферативний індекс свідчить про високий ступінь агресивності пухлинного процесу і може використовуватись для діагностики матастатичного ураження РПЗ. З огляду на вищесказане, можна зробити висновок, що підвищена експресія Ki-67 у зразках біопсійного матеріалу пов'язана з несприятливими клініко-патологічними факторами прогнозу та низькими показниками виживаності хворих на РПЗ і може надавати

додаткову прогностичну інформацію, порівняно з оцінкою за Глісоном, та концентрацією ПСА [113]. Тому визначення Ki-67 частіше використовується у комбінації з іншими клініко-морфологічними показниками.

В сучасній літературі активно обговорюється значення ПСК для прогнозування перебігу РПЗ. Згідно теорії, рак може виникати і розвиватися з невеликої кількості так званих ПСК, які здатні викликати ріст пухлини, а також впливати на чутливість до хіміо- і променевої терапії [114]. Сьогодні, для ідентифікації ПСК при РПЗ застосовують кілька різних маркерів. Найперспективнішими і значимими серед них є CD24 [115], CD44 [115], CD133 [116, 117], альдегід дегідрогеназа (ALDH) [118], $\alpha 2 \beta 1$ -інтегрин [119] і т.д. Ці маркери були протестовані окремо і в декількох комбінаціях, але оптимальне їх поєднання досі не знайдене. Причиною такої ситуації є значна різноманітність гістологічних типів пухлин і їх молекулярно-генетична гетерогенність.

CD44 (Pgp-1, Ly-24, H-CAM, рецептор хоумінга лейкоцитів, HUTCH-1, Hermes) – трансмембранний глікопротеїн, раніше розглядався виключно як молекула міжклітинної адгезії, а в даний час вважається одним з основних маркерів ПСК. Кодує ген розміром близько 50 тис. пар основ розташований на хромосомі 11p13 і складається з 20 екзонів. В результаті альтернативного сплайсингу, посттрансляційних модифікацій і часткового розщеплення матриксними металопротеазами в клітині можуть існувати множинні ізоформи CD44 [120]. CD44 є рецептором гіалуронану та інших лігандів, до яких належать остеопонтин, колаген I та IV типів, металопротеїнази екстрацелюлярного матриксу [121], а також корецептором ряду поверхневих рецепторів (EGFR, Her2/neu, Met6, TGF β RI, TGF β RII, VEGFR-2), що робить його складовою різноманітних сигнальних шляхів, які стимулюють ріст і рухливість пухлинних клітин [122]. Зокрема, при зв'язуванні з TGF β RI та TGF β RII, анкірином і Smad-залежною кіназою CD44 активує епітеліально-мезенхімальний перехід. Тобто CD44 може інтегрувати різноманітні сигнали від молекул позаклітинного матриксу, рецепторів і внутрішньоклітинних стимулів і брати участь у регуляції проліферації, міграції і диференціюванні

клітин [122]. Встановлено, що високий рівень експресії CD44, та деяких його ізоформ корелював з наявністю метастазів у хворих на РПЗ, високим балом Глісона, а також високим проліферативним потенціалом пухлин[123].

Мембранний білок CD24 складається з 31 амінокислоти та кодується геном, що розташований на хромосомі 6q21. Для структури CD24 людини характерна наявність мультисайтів N- або O-глікозилювання, а також додаткових сайтів серину і залишків треоніну, що робить його подібним до молекули муцину. Білок CD24, ізольований від різних тканин або типів клітин, має різну молекулярну масу — у межах від 20 до 70 кДа, що свідчить про високу варіабельність гена в різних типах клітин [124-126]. Функціонування CD24 змінюється залежно від ліганда, який здійснює його гліколіз, при цьому він забезпечує міжклітинну або клітинно-матричну взаємодію. CD24 відіграє важливу роль в адаптивній імунній відповіді, запаленні, при аутоімунних захворюваннях, контролює проліферацію, адгезію, інвазію, міграцію та метастазування злоякісно трансформованих клітин. CD24 вважають онкобілком, оскільки з високою частотою він експресується у пухлинних клітинах яєчника, молочної, передміхурової та підшлункової залоз, шлунку тощо [122]. У хворих на РПЗ експресія CD24 в пухлинній тканині є важливим прогностичним маркером, який може бути використаним для визначення ризику виникнення рецидиву захворювання [126, 128].

Незважаючи на величезну кількість робіт присвячених вивченню ПСК, до цього часу залишається остаточно не з'ясованим їхній зв'язок з клінічними характеристиками РПЗ різних гістологічних типів, з метастатичною активністю пухлин та показниками виживаості хворих.

На сьогодні існують відомості про те, що деякі залізовмісні білки відіграють важливу роль на різних етапах канцерогенезу і на цій підставі можуть розглядатись як потенційні маркери злоякісної прогресії і перспективні мішені для протипухлинної терапії. Серед залізовмісних білків найменш вивченим у патогенезі та клінічному перебігу РПЗ є ЛФ. ЛФ – це залізовзв'язуючий глікопротеїн родини трансферинів з молекулярною масою 83

кДа [128]. ЛФ є нормальним секреторним продуктом ПЗ і периуретральних залоз, в той же час ЛФ відносять до білків гострої фази запалення, бо він синтезується лейкоцитами і є показником їх дегрануляції при запальному процесі. При захворюваннях ПЗ рівень ЛФ в її секреті формується з двох джерел: секреція ПЗ та дегрануляція лейкоцитами. Тобто, ЛФ відображає як власну білоксинтезуючу активність ПЗ, так і вираженість запального процесу, що характеризується дегрануляцією лейкоцитів [128].

ЛФ виконує ряд важливих біологічних функцій – протипухлинну, антибактеріальну, антиоксидантну та імунорегулюючу, контроль проліферації та диференціювання клітин. Проникаючи в ядра клітин, він зв'язується зі специфічними послідовностями ДНК і активує процеси транскрипції, але його значення у патогенезі гормонзалежних злоякісних пухлин залишається остаточно не вивченим [129].

Зниження рівня ЛФ в сироватці крові відбувається при аутоімунних тиреоїдитах та системному червоному вовчаку у період загострення; при вірусній інфекції; при патології органів гепатобіліарної системи. Крім того, встановлено, що злоякісні пухлини ПЗ характеризуються різким зниженням або повною втратою синтезу ЛФ, що може слугувати маркером розвитку пухлинного процесу [130].

Таким чином, як видно зі сказаного раніше, сьогодні в арсеналі онкоурологів є велика кількість різних біомаркерів, що можуть допомогти в прогнозуванні перебігу РПЗ. Проте їх переважна більшість не увійшла в рутинну практику через низку причин.

РЕЗЮМЕ

Згідно останніх даних статистики, РПЗ займає лідуючі позиції за показниками захворюваності та смертності в структурі онкологічних захворювань як в Україні так і в світі. Відзначено тенденцію до омолодження контингенту хворих на РПЗ, хоча це захворювання все ще залишається онкологічною патологією чоловіків похилого і старечого віку. РПЗ мультифокальним захворюванням з різними клінічними та морфологічними характеристиками, що зумовлено його значною гетерогенністю на геномному, епігенетичному та протеомному рівнях. 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. З огляду на це, оцінка ступеня злоякісності новоутворень може допомогти відокремити пацієнтів, яким показано активне спостереження, від тих, яким потрібне радикальне лікування, а також дозволяє з'ясувати особливості перебігу пухлинного процесу та його потенції до прогресування.

Сьогодні актуальності набуває визначення панелі молекулярно-біологічних та епігенетичних біомаркерів РПЗ, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу. Саме тому доцільними вважаються комплексні молекулярні дослідження РПЗ, значна увага в яких приділяється окремим ланкам канцерогенезу, зокрема змінам спричиненим внаслідок дії 5 α -дигідротестостерону (5 α -ДГТ).

Як відомо, з віком у чоловіків підвищується рівень 5 α -ДГТ внаслідок збільшення кількості 5-альфа-редуктази в ПЗ [131]. 5 α -ДГТ індукує в клітинах залози синтез інсуліноподібного фактору росту. Ці фактори у свою чергу діють аутокринно на стромальні клітини, а також паракринним шляхом впливають на епітеліальні клітини ПЗ, посилюючи в них синтез РНК та білків (у тому числі ПСА), а також підвищення експресії мікроРНК-214 [132], як одного з основних

медіаторів його дії на епігенетичному рівні, і як наслідок, активації *NANOG* [133] та інгібування експресії ЛФ [134] (Рис. 1.3.1).

З огляду на це, виявлення молекулярно-генетичних та епігенетичних особливостей РПЗ людини асоційованих з агресивністю перебігу пухлинного процесу дозволять розширити та уточнити існуючі знання про патогенез цієї форми раку, а також виявити нові маркери для визначення ступеня злоякісності цієї онкопатології і персоніфікації терапії.

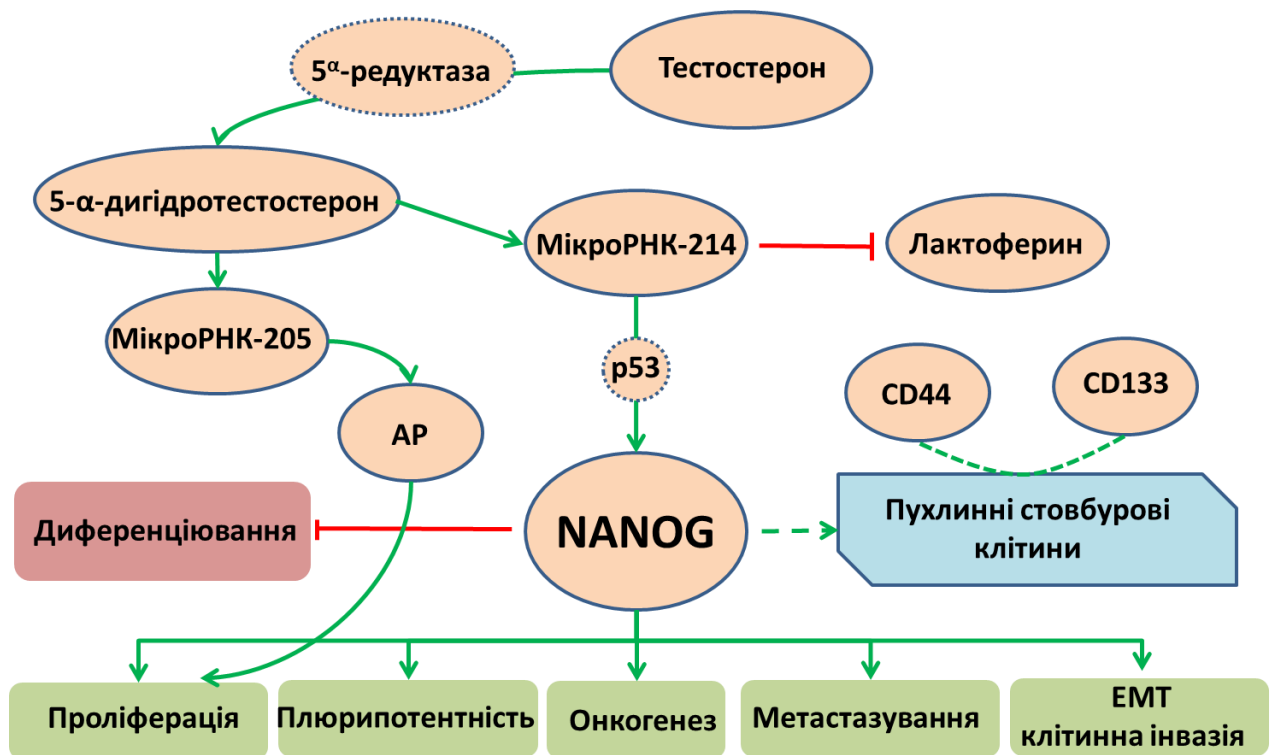


Рис. 1.3.1. - Молекулярно-біологічні особливості злоякісно трансформованих клітин ПЗ внаслідок дії 5α-дигідротестостерону

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика клітин ліній РПЗ та умови їх культивування

Дослідження проведено на 2-х клітинних лініях РПЗ людини. Детальна характеристика ліній, використаних в експериментах *in vitro* подана у таблиці 2.1.1. Для проведення експериментальних досліджень лінії клітин були отримані з клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Таблиця 2.1.1.

Гістогенетичне походження клітин досліджених ліній

Назва лінії	Гістогенетичне походження	Автор
LNCaP	Метастатична аденокарцинома РПЗ. Отримана з пухлинних клітин, виділених з метастазу у лівосторонній суглобовий лімфатичний вузол хворого на РПЗ	Horoszewicz JS, et al, 1977
DU145	Метастатична аденокарцинома РПЗ, отримана з пухлинних клітин, виділених з метастазу у головний мозок хворого на РПЗ	Stone KR, et al, 1978

LNCaP – класична клітинна лінія аденокарциноми ПЗ людини, одержана з надключичного лімфатичного вузла з метастазами. У клітинах культури присутні високоафінні специфічні AR у цитоплазмі і ядрі. ER α присутні в цитоплазмі, тому ця клітинна лінія є гормонально-чутливою.

Клітинна лінія DU145 одержана з агресивного РПЗ. Пухлини з клітинної лінії DU145 (з клітин метастазів у мозок) виявляють середній потенціал до

метастазування на моделях *in vivo*. Клітинна лінія DU145 є гормонорезистентною та відрізняється відсутністю експресії ПСА.

Умови культивування клітин досліджених ліній:

1) Клітини лінії LNCaP культивували в модифікованому середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Sigma, США).

2) Клітини лінії DU-145 культивували в середовищі Eagle's Minimum Essential Medium (Sigma, США) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Sigma, США).

Клітини обох досліджених ліній культивували у зволоженій атмосфері з 5% CO₂, при температурі 37°C. Клітини пересівали двічі на тиждень з щільністю посіву 2-4x10⁴ клітин на см² поверхні. Пересів клітин робили, коли 70% поверхні ємкості для культивування клітин було зайнято клітинами.

2.2. Методи експериментального дослідження клітин ліній РПЗ

2.2.1. Цитоморфологічний метод дослідження

Цитоморфологічні дослідження проводили після фарбування препаратів клітин РПЗ людини (LNCaP та DU-145) за Романовським-Гімза.

Для виготовлення цитологічних препаратів клітини вирощували протягом однієї доби за стандартних умов на покривних скельцях, які знаходилися в стерильних чашках Петрі, заповнених культуральним середовищем. Через добу поверхня скелець була зайнята клітинами на 80%. Скельця діставали з чашок Петрі, відмивали від залишків середовища у фізіологічному розчині та фарбували за Романовським-Гімза.

На першому етапі фарбування на скельця наносили азур-еозин за Романовським у розведенні 1:5 на 1 хвилину. Потім, не змиваючи барвник, на скельця додавали декілька крапель дистильованої води на 30 секунд. Барвник змивали проточною водою. На другому етапі обробки препаратів проводилось фарбування досліджених клітин розчином Майн-Грюнвальда ("Thermo

Scientific”, USA), який наносили на скельця на 45 секунд з подальшим відмиванням проточною водою та підсушуванням. Препарати досліджували за допомогою мікроскопа Primo Star (Zeiss, Німеччина) при збільшенні 1000.

2.2.2. Імуноцитохімічний метод

Для проведення імуноцитохімічного аналізу (ІЦХ) клітини досліджених ліній вирощували на покривних скельцях протягом 1 доби, після чого фіксували розчином метанолу і ацетону у співвідношенні 1:1 протягом 2 годин при $t -20^{\circ}\text{C}$ та досліджували експресію молекулярних маркерів із застосуванням відповідних моноклональних антитіл (Табл. 2.2.1).

Таблиця 2.2.1

Моноклональні антитіла, які були використані для проведення імуноцито- та імуногістохімічних досліджень

Молекулярний маркер	Клон	Розведення	Фірма - виробник
AR	441	1:50	ThermoScientific, USA
ER α	1D5	1:50	DakoCytomation, Denmark
ER β	14C8	1:50	Thermo Scientific, USA
PR	PgR636	1:50	DakoCytomation, Denmark
Her2/neu	e2-4001	1:50	Thermo Scientific, USA
Ki-67	MIB-1	1:100	DakoCytomation, Denmark
Е-кадгерин	NCH-38	1:100	Thermo Scientific, USA
N-cadherin	CD235	1:100	DiagnosticBioSystems, USA
CD44	156-3C11	1:300	Thermo Scientific, USA
CD24	SN3	1:200	ThermoScientific, USA
ЛФ	JE49-60	1:300	ThermoScientific, USA

Для детекції ІЦХ реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (кон'юговані вторинні антитіла

antiMouse з полімерним ланцюгом декстринової молекули) фірми “Thermo Scientific”, USA, склад якої наведено в Табл. 2.2.2. Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували гематоксиліном Майєра (“Thermo Scientific”, USA) протягом 15 – 30 секунд і заключали в FaramountAqueousMountingMedium (“Thermo Scientific”, USA).

Таблиця 2.2.2

**Склад реагентів системи візуалізації Lab Vision™ UltraVision™
Quanto Detection System**

№	Назва реагенту	Об'єм
1	UltraVision Hydrogen Peroxide Block	15 мл
2	UltraVision Protein Block	15 мл
3	Primary Antibody Enhancer	15 мл
4	HRP Polymer	15 мл
5	DAB Quanto Substrate	15 мл
6	DAB Quanto Chromogen	1 мл

Для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів, кожного разу при проведенні ІЦХ досліджень ставили контрольні реакції.

Аналіз результатів ІЦХ реакції проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина), використовуючи збільшення x100-400. Для кількісної оцінки експресії досліджених маркерів при ІЦХ дослідженнях використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N_0 (\%) + 3 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 1 \times N_3 (\%),$$

де S – показник «H-Score»,

N_0 – кількість клітин з відсутньою експресією,

N_1 +, N_2 + та N_3 + – з низькою, середньою та високою експресією, відповідно.

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 [135, 136].

2.2.3. Метод дослідження інвазивних властивостей злоякісно трансформованих клітин *in vitro*

Вивчення інвазивного потенціалу клітин РПЗ проводили за допомогою Transwellassay, з використанням синтетичної мембрани для інвазії (BDBioCoat™ Matrigel™ InvasionChamber, Bedford, MA) з порами розміром 8 мікрон відповідно до інструкції виробника (BDBiosciences). У верхній відділ лунок вносили суспензію клітин з концентрацією 5×10^4 клітин/лунку в поживному середовищі без додавання сироватки ембріонів теляти, в нижній відділ лунок вносили стандартне ростове середовище з 10% телячої ембріональної сироватки, після чого інкубували клітини за стандартних умов при $t\ 37^\circ\text{C}$ у зволоженій атмосфері з 5% CO_2 протягом 48 годин. Після цього мембрани фіксували за допомогою метанолу та дофарбовували кристалічним фіолетовим. Клітини, що лишились у верхньому відділі лунок, змивали та підраховували за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина).

2.2.4. Метод дослідження експресії мікроРНК та її оцінка в злоякісно трансформованих клітинах у системі *in vitro*

Для дослідження експресії мікроРНК у клітинах РПЗ застосовано метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

Виділення тотальної РНК з клітин проводили за допомогою комерційного набору “NucleoZOL” (MachereyNagel, Германія). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі “NanoDrop 2000c Spectrophotometer”

(ThermoScientific, США). Частоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у трис-ЕДТА буфері та до проведення ПЛР зберігали при $t=20^{\circ}\text{C}$.

Одноланцюгову ДНК синтезували з 100 нг загальної РНК з використанням набору TaqMan для зворотної транскрипції. Для проведення ПЛР зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) використовували реакційну суміш, склад якої наведено в Табл. 2.2.3.

Таблиця 2.2.3

Склад реакційної суміші для проведення ЗТ-ПЛР

Компоненти реакційної суміші	Кількість компонентів на 5 мкл реакційної суміші (в мкл)
100 мМ суміш дезоксинуклеотидів	0,05
Зворотна транскриптаза Multiscribe, 50 U/мкл	0,33
10х буфер для РТ	0,50
Інгібітор РНКаз	0,06
Вода, очищена від нуклеаз	1,56
5х праймер для міРНК TaqMan	1,00
Зразок загальної РНК	1,50
Всього:	5,0

ЗТ-ПЛР проводили в ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) з використанням наступних параметрів реакції (Табл. 2.2.4).

Таблиця 2.2.4

Температурні умови проведення ЗТ-ПЛР

Крок	Час (хв.)	Температура (C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

QRT-ПЛР проводили на системі виявлення AppliedBiosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System послідовності з використанням TaqManMicroRNA Assay. Після закінчення ЗТ-ПЛР до продукту реакції додавали суміш реагентів (Табл. 2.2.5) і проводили ПЛР у реальному часі за заданими умовами (Табл. 2.2.6).

Таблиця 2.2.5

Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент реакційної суміші	Кількість на 20 мкл реакційної суміші
2х-універсальна суміш TaqManMastermix (без AmpErase)	10,00
Вода, очищена від нуклеаз	4,00
20х суміш для ПЛР TaqManMicroRNAAssays	1,00

Відносна експресія досліджуваних мікроРНК була визначена порівняльним СТ методом. Дослід проведений у трьох паралелях для кожної лінії, і ПЛР у трьох повторностях для кожного зразка.

Таблиця 2.2.6

Умови проведення ПЛР (кількість зразка – 20 мкл)

Крок	Активация білка AmpliTaqGold	Полімеразна ланцюгова реакція	
	HOLD	Цикл (40 циклів)	
		Денатурація	Подовження ланцюга
Час	10 хв	15 с	60 с
Температура (0C)	95	95	60

Пороговий цикл був усереднений в усіх технічних і біологічних репліках всередині кожної лінії. Різницю фолду (Foldchange, folddifference) між експресією досліджуваних мікроРНК обчислювали за формулою $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Похибки для розрахунків різниці фолду показують діапазон значень $\Delta\Delta C_t$, оснований на включенні стандартного відхилення в ці значення.

Послідовності праймерів, для ЗТ-ПЛР та ПЛР в реальному часі були визначені за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/> (Табл. 2.2.7) та синтезовані компанією Metabion, Німеччина.

Таблиця 2.2.7

Послідовності праймерів для визначення експресії мікроРНК

мікроРНК ID	Послідовність зрілої мікроРНК	Stem-loop праймер для синтезу кДНК	Forward праймер
hsa-mir-let7	5'- UGAGGUAGUA GUUUGUGCUGU U -3'	5'- GTCGTATCCAGTGCAG GGTCCGAGGTATTTCGC ACTGGATACGACAACA GC -3'	5' – CGGTGAGGTA GTAGTTTGTG- 3'
hsa-mir-21	5' – UAGCUUAUCAG ACUGAUGUUGA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAG GGTCCGAGGTATTTCGC ACCAGAGCCAACTCAA CA - 3'	5' - GTTTGGTAGC TTATCAGACT GA - 3'
hsa-mir-126	5'- CAUUAUUACUU UUGGUACGCG- 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAG GGTCCGAGGTATTTCGC ACCAGAGCCAAC CGCATT - 3'	5'- GGGTCGTACC GTGAGTAAT - 3'
hsa-mir-199a	5'- CCCAGUGUUCA GACUACCUUU C-3'	5'- CTCAACTGGTGTCGTG GAGTCGGCAATTCAGT TGAGGAACAGGT-3'	5' - GGGACAGTAG TCTGCACAT - 3'
hsa-mir-200b	5' - UAAUACUGCCU GGUAAUGAUG A - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAG GGTCCGAGGTATTTCGC ACCAGAGCCAAC TCAT CA - 3'	5' - GTTTGGTAAT ACTGCCTGGT AA - 3'
hsa-mir-205	5'- UCCUUCAUUC ACCGGAGUCUG -3'	5'- CTCAACTGGTGTCGTG GAGTCGGCAATTCAGT TGAGCAGACTCC-3'	5'- GTTTCCTTCAT TCCACCGG-3'
hsa-mir-214	5'- UGCCUGUCUAC ACUUGCUGUGC -3'	5'- CTCAACTGGTGTCGTG GAGTCGGCAATTCAGT TGAGGCATTATT-3'	5' - GTTACAGCAG GCACAGACA - 3'
hsa-mir-320a	5' - AAAAGCUGGGU UGAGAGGGCGA - 3'	5' - GTTGGCTCTGGTGCAG GGTCCGAGGTATTTCGC ACCAGAGCCAAC TCGC CC - 3'	5' - GGGAAAAGCT GGGTTGAGA - 3'

Відповідно до методики stem-loop miRNA RT-PCR було використано універсальний reverse primer 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT – 3' для всіх мікроРНК з Табл. 2.2.7 [137].

В якості ендogenous контролю для нормалізації показників експресії використовували мікроРНК U6 (RNU6-1), яка є стандартом для клітинних ліній РПЗ. Дана мікроРНК є однією з валідованих house-keeping малих РНК для досліджень на моделях РПЗ людини як *in vitro*, так і на клінічному матеріалі [138].

Послідовності праймерів взяті з ресурсу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>: RT-праймер: 5'-CGCTTC ACGAATTTGCGTGTCAT-3'; forward, 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' reverse, 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'.

2.3. Клінічна характеристика хворих на РПЗ

Дослідження ґрунтується на аналізі результатів обстеження і лікування 233 хворих на РПЗ II-IV стадії. Хворі знаходились на лікуванні у Національному інституті раку МОЗ України, ДУ «Інститут урології НАМН України» та Київському міському клінічному онкологічному центрі в період 2014-2017 рр.

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 ПЗ під ультразвуковим контролем. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародною класифікацією пухлин (TNM, 7 та 8 видання, 2009, 2016). Гістологічний тип видалених пухлин

верифікували при морфологічному дослідженні гістологічних зрізів парафінових блоків пухлин (фарбування зрізів гематоксиліном та еозином) відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації BOOЗ (2006).

2.3.1. Клінічна характеристика хворих на РПЗ проспективної групи

Клінічна характеристика 113 хворих на РПЗ II-IV стадії наведена у Табл. 2.3.1. Кількість хворих на РПЗ стадії II становила 32,7%, стадії III – 30,0%, IV- 37,3 %. Вік хворих коливався від 45 до 80 років, середній вік – $63,0 \pm 5,8$ роки.

У 32,7% пацієнтів новоутворення були локалізованими в межах ПЗ (категорія T2), у 65,5% хворих пухлини виходили за межі капсули органу (категорія T3), у 1,8% хворих пухлини проростали в оточуючі ПЗоргани (категорія T4).

Результати комплексного обстеження хворих (рентгенологічне, ультразвукове, лабораторне) показали наявність метастазів у РЛВ вузли у 37,2 % та відсутність віддалених метастазів у всіх хворих на РПЗ.

Морфологічне дослідження дозволило встановити, що серед усіх досліджених пухлин 39,8% були помірно-диференційованими аденокарциномами (сума балів за Глісоном < 7), а 60,2% – низько диференційованими аденокарциномами (сума балів за Глісоном ≥ 7). За рівнем ПСА хворі були розподілені на 2 групи: I група – рівень ПСА до 4 нг/мл (33,6 %), та II група – більше 10 нг/мл (66,4 %).

У 38,9% хворих був виявлений біохімічний рецидив пухлини ПЗ. Найбільша частота рецидивів спостерігалась в перший рік після оперативного втручання, в подальшому відзначалось значне зниження на другому році спостереження.

Таблиця 2.3.1

**Загальна клінічна характеристика хворих на РПЗ II-IV
стадії проспективної групи**

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	113	100
Вік хворих (роки)		
Середній	63,0±5,8	
Коливання віку	45 – 80	
Клінічна стадія захворювання		
Стадія II	37	32,7
Стадія III	34	30,0
Стадія IV	42	37,3
Категорія T за TNM		
T2	37	32,7
T3	74	65,5
T4	2	1,8
Категорія N за TNM		
N ₁	42	37,2
N ₀	71	62,8
Сума балів за Глісоном		
<7 балів	45	39,8
≥7 балів	68	60,2
Рівень ПСА		
<10 нг/мл	38	33,6
>10 нг/мл	75	66,4

В якості контролю було проаналізовано 20 зразків візуально незміненої тканини ПЗ.

2.3.2. Клінічна характеристика хворих на РПЗ ретроспективної групи

До ретроспективної групи увійшло 120 хворих на РПЗ II-IV стадії РПЗ, що знаходились на лікуванні в ДУ «Інститут урології НАМН України» та

Київському міському клінічному онкологічному центрі впродовж 2014-2015 рр. Загальна клінічна характеристика хворих представлена у Табл. 2.3.2. Середній вік хворих становив $59,0 \pm 3,4$ з індивідуальними коливаннями від 51 до 81 років. Переважну більшість склали хворі на РПЗ стадії II - 58,3%, тоді як пацієнтів з III та IV стадіями захворювання було 26,6% та 15,1%, відповідно.

Таблиця 2.3.2

**Загальна клінічна характеристика хворих на РПЗ II-IV
стадіїретроспективної групи**

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	120	100
Вік хворих(роки)		
Середній	59,0±3,4	
Коливання віку	51 – 81	
Стадія РПЗ		
Стадія II	70	58,3
Стадія III	32	26,6
Стадія IV	18	15,1
Категорія T за TNM		
T2	73	60,8
T3	36	30,0
T4	11	9,2
Категорія N за TNM		
N ₁	15	12,5
N ₀	105	87,5
Сума балів за Глісоном		
<7 балів	35	29,2
≥7 балів	85	70,8
Рівень ПСА		
<10 нг/мл	43	35,8
>10 нг/мл	77	64,2
Біохімічний рецидив		
Встановлено	37	30,8
Не виявлено	83	69,2

У 60,8 % пацієнтів новоутворення були локалізованими в межах ПЗ (категорія T2), тоді як у 26,6% хворих пухлини виходили за межі капсули органу, або ж проростали в оточуючі ПЗ органи (9,2% осіб).

Згідно результатів комплексного обстеження хворих у 12,5% осіб виявлено наявність метастазів у РЛВ. Віддалених метастазів РПЗ не виявлено.

Хворих на РПЗ було розділено на 2 підгрупи залежно від суми балів за Глісоном: <7 балів – 29,2 % та ≥ 7 балів – 70,8 % пацієнтів. У більшості хворих (64,8%) рівень ПСА в сироватці крові становив більше 10 нг/мл.

Після оперативного втручання, протягом 2 років, всі хворі проходили планові обстеження для виявлення можливого розвитку біохімічного рецидиву. Наявність біохімічного рецидиву (30,8% хворих) визначали при підвищенні рівня ПСА $> 0,2$ нг/мл протягом 2-х послідовних обстежень. Найбільша частота рецидивів спостерігалась в перший рік після оперативного втручання, в подальшому відзначалось значне зниження на другому році спостереження.

2.4 Методи дослідження клінічного матеріалу

2.4.1. Морфологічне дослідження операційного матеріалу

Операційний матеріал фіксували впродовж однієї доби при кімнатній температурі в 10% розчині забуференого нейтрального формаліну (40% формалін – 100 мл, однозаміщений фосфат натрію (моногідрат) – 4 г, двохзаміщений фосфат натрію (безводний) – 6,5 г). Потім промивали його у проточній воді протягом 1 години. Надалі матеріал поступово зневоднювали у розчинах етилового спирту висхідної концентрації (50°, 70°, 80°,) та у 2 порціях 96° етанолу (використовували замість абсолютного спирту) і піддавали целоїдин-парафіновій гістологічній проводці з наступною заливкою в парафінові блоки з додаванням 5% натурального воску.

За допомогою санного мікротома виготовляли зрізи товщиною 5-7 мкм, які розміщували на хімічно чистих предметних скельцях. Перед фарбуванням тканин проводили депарафінізацію зрізів, витримуючи їх протягом 20 хв у 2

порціях ксилолу, потім стільки ж часу у 96 % етиловому спирті. Фарбування проводили, наносячи на зрізи гематоксилін 7211 (“Thermo Scientific”, USA). Через 5 хв надлишок гематоксиліну видаляли, а скельця зі зрізами залишали у проточній воді до набуття тканиною характерного темно-синього забарвлення. Зрізи тканини дофарбовували в спиртовому розчині еозину-Y (“Thermo Scientific”, USA) протягом 1с з подальшою інкубацією скелець в розчині етанол-еозин (1:1) та етиловому спирті по 10 хв, відповідно. Після цього скельця витримували у ксилолі до посвітління тканинних зразків.

2.4.2. Дослідження експресії молекулярних маркерів у пухлинній тканині хворих за допомогою імуногістохімічного методу

Для імуногістохімічного дослідження експресії досліджуваних маркерів в пухлинних клітинах використали стандартний стрептавідин-біотин-пероксидазний метод на гістологічних зрізах, виготовлених з парафінових блоків пухлин після їх фіксації у 10% розчині нейтрального формаліну.

Першим етапом імуногістохімічної реакції була депарафінізація гістологічних зрізів. Для цього скельця з гістологічними зрізами занурювали в орто-ксилол на 20 хв. з наступною обробкою 96° етанолом протягом 20 хв та подальшим промиванням у двох порціях дистильованої води по 3 хв. Демаскування антигенів проводили шляхом обробки зрізів у цитратному буфері рН 6,0 в паровій бані (Biosan WB-4MS, Latvia) протягом 20 хв з подальшим з охолодженням при кімнатній температурі. Цитратний буфер виготовляли із 10,0 мл 0,1М розчину лимонної кислоти і 40,0 мл 0,1М розчину цитрату натрію, доведеного до об'єму 500,0 мл дистильованою водою.

Наступні етапи імуногістохімічної реакції були такими:

1. Охолоджували препарати при кімнатній температурі до +25°C, двічі промивали у трьох порціях дистильованої води по 2 хв.
2. Проводили блокування ендогенної пероксидази 3 Hydrogen Peroxidase Block протягом 10 хв. при кімнатній температурі, двічі промивали у

різних порціях дистильованої води по 2 хв. і тричі у різних порціях фосфатного буферу (PBS) pH 7,4 по 5 хв.

3. Надлишок буферу обережно, не торкаючись зрізу і не допускаючи висихання останнього, забирали з двох боків клаптиками фільтрувального паперу і розташовували у вологій камері, де виконували всі наступні процедури.

4. Блокування неспецифічних білків (для запобігання неспецифічного забарвлення) здійснювали шляхом інкубації зрізів у присутності Ultra V Block протягом 30 хв. при кімнатній температурі.

5. У пухлинній тканині досліджували експресію молекулярних маркерів шляхом застосовування відповідних моноклональних антитіл (Табл. 2.2.1). Інкубацію в оптимальному розведенні моноклональних антитіл на протязі однієї години. Через 30 хвилин зрізи відмивали 3 рази у PBS. Для візуалізації білка застосовували систему Ultra Vision LP Detection System (кон'юговані вторинні антитіла antiMouse з полімерним ланцюгом декстринової молекули) фірми Thermo Scientific (США), яку наносили і залишали на зрізі при кімнатній температурі протягом 30 хв. Забарвлення білка здійснювали за допомогою хромогену – 3,3'-діамінобензидину тетрахлориду, продукт реакції якого має коричневий колір.

6. Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра.

Для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів, кожного разу при проведенні імуногістохімічних досліджень ставили контрольні реакції. У якості позитивного контролю використовували препарати зі зрізами тканин, у яких було встановлено гіперекспресію маркеру. За негативний контроль брали паралельні зрізи пухлин яєчника, на які не наносили моноклональні антитіла.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина), використовуючи збільшення x100-400. 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.

2.4.3. Дослідження експресії молекулярних маркерів, асоційованих з фенотипом ПСК в пухлинній тканині хворих на РПЗ за допомогою імуногістохімічного методу

Виявлення маркерів ПСК проводили на паралельних, депарафінованих зрізах із застосуванням непрямого імунопероксидазного методу. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла зазначені у Табл. 2.4.1. у розведеннях відповідно до інструкції виробника. Для візуалізації білків використовували систему MultiVision Polymer Detection System: anti-Mouse-HRP and anti-Rabbit-AP фірми Thermo Scientific (USA).

Таблиця 2.4.1

Моноклональні антитіла, які були використані для проведення імуногістохімічного визначення маркерів ПСК

Молекулярний маркер	Клон	Розведення	Фірма - виробник
CD44	clone SP37	1:50	Máster Diagnóstica, Spain
CD24	clone SN3b	1:100	Thermo Scientific, USA

Демаскування антигенів проводили шляхом обробки зрізів у цитратному буфері pH 6,0 в паровій бані (Biosan WB-4MS, Latvia) протягом 20 хв з подальшим з охолодженням при кімнатній температурі та відмиванням у деіонізованій воді.

Методика візуалізації білків включала наступні етапи:

1) Проводили блокування ендогенної пероксидази за допомогою Hydrogen Peroxidase Block на 10 хв при кімнатній температурі, з подальшим відмиванням вPBS.

2) Блокування неспецифічних білків (для запобігання неспецифічного забарвлення) здійснювали шляхом інкубації зрізів у присутності Ultra V Block на 10 хв при кімнатній температурі, після чого надлишок розчину забирали за допомогою фільтрувального паперу.

3) Нанесення первинних антитіл на 30 хвилин при кімнатній температурі, з подальшим відмиванням в PBS.

4) Нанесення полімерного коктейлю MultiVision Polymer Cocktail: anti-mouse/ horseradish peroxidase (HRP) + anti-rabbit/ alkaline на 30 хвилин при кімнатній температурі та промивали в PBS.

5) Забарвлення здійснювали за допомогою попередньо приготованих згідно рекомендацій виробника фарб LVBlue та LVRed, які наносили на 15 хв та 10 хв відповідно і відмивали у PBStа деіонізованій воді. Дофарбовування зрізів тканини гематоксіліном Меєра не проводилося.

6) Скельця просушували і фіксували в середовищі Cytoseal 60 (Thermo Scientific Richard-Allan, USA)

Для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів, кожного разу при проведенні імуногістохімічних досліджень ставили контрольні реакції.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина), використовуючи збільшення $\times 100$ - 400 . Пухлину вважали позитивною за фенотипом ПСК за умови наявності $\geq 10\%$ клітин з експресією $CD44^{+}CD24^{-/low}$.

2.4.4. Визначення експресії мРНК NANOG в тканині РПЗ

Визначення експресії мРНК Nanog в тканині РПЗ проводили з використанням стандартного набору для реверс-транскрипції "РЕВЕРТА-L"

(АмплиСенс, РФ). В якості ендogenousного контролю використовувалась мРНК β -актину. Визначення експресії мікроРНК виконувалось за алгоритмом, описаним в розділі 2.2.4. Послідовності праймерів для ПЛР в реальному часі наведені в Табл. 2.4.2.

Таблиця 2.4.2

Послідовності праймерів для ПЛР в реальному часі

	Forward	Reverse	Довжина готового продукту
Nanog	5'-CAGTCTGGA CACTGGCTGAA-3'	5'- CTCGCTGAT TAGGCTCCAAC-3'	149bp
β -actin	5'- ACAGGGGAG GTGATAGCATT-3'	5'-GACCAAAAGCCT TCATACATCTC-3'	100bp

2.4.5. Визначення експресії мікроРНК в пухлинній тканині та сироватці крові пацієнтів з РПЗ

Для дослідження експресії мікроРНК на клінічному матеріалі хворих (в сироватці крові та пухлинній тканині) було застосовано метод ПЛР у реальному часі [90]. Тотальну РНК з парафінових блоків отриманих від хворих на РПЗ виділяли за допомогою комерційного набору “RNeasy FFPE Kit” (QIAGEN, Німеччина), а з сироватки крові – NucleoSpin® miRNA Nucleospin (MACHEREY-NAGEL, Німеччина), згідно протоколу виробника. Визначення експресії мікроРНК виконувалось за алгоритмом, описаним в розділі 2.2.3.

Для досліджень *ex vivo* в сироватці крові та пухлинній тканині в якості ендogenousного контролю використовували малу ядерцеву RNU48 [139], оскільки рівні U6 не рекомендовано використовувати для нормальних показників циркулюючих мікроРНК. Послідовності праймерів взяті з ресурсу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>: RT-праймер: 5' - CTCTGACC – 3', forward 5' - AGTGATGATGACCCCAGGTAACCTC – 3', reverse 5' - CTGCGGTGATGGCATCAG - 3'.

2.5. Метод біоінформатичного аналізу

Для пошуку та аналізу функціональних зв'язків та взаємодій між дослідженими молекулярно-біологічними маркерами були використані база даних та алгоритм STRING (<http://www.string-db.org/>), version 11.0. До уваги бралися зв'язки характерні організму *Homo sapiens*.

2.6. Методи статистичної обробки одержаних результатів

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. Вживаність 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 процентного співвідношення для відносних величин. Критичний рівень статистичної значимості приймали рівним 0,05.

РОЗДІЛ 3

ФЕНОТИПОВІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНІ ОЗНАКИ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ РПЗ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ

3.1. Цитоморфологічна характеристика клітинних ліній РПЗ людини

Дослідження цитологічних препаратів, виготовлених з клітин ліній РПЗ людини показали наступне (Рис. 3.1.1): клітини лінії LNCaP не утворюють рівномірного моношару, але ростуть у скупченнях з чітко окресленими краями, які по мірі наростання клітин зливаються між собою. Клітини в центрі скупчення мають правильну геометричну форму з чітко вираженими виростами. Клітини, які знаходяться на краю зони росту утворюють чіткі ряди, більшість з яких циліндричної форми.

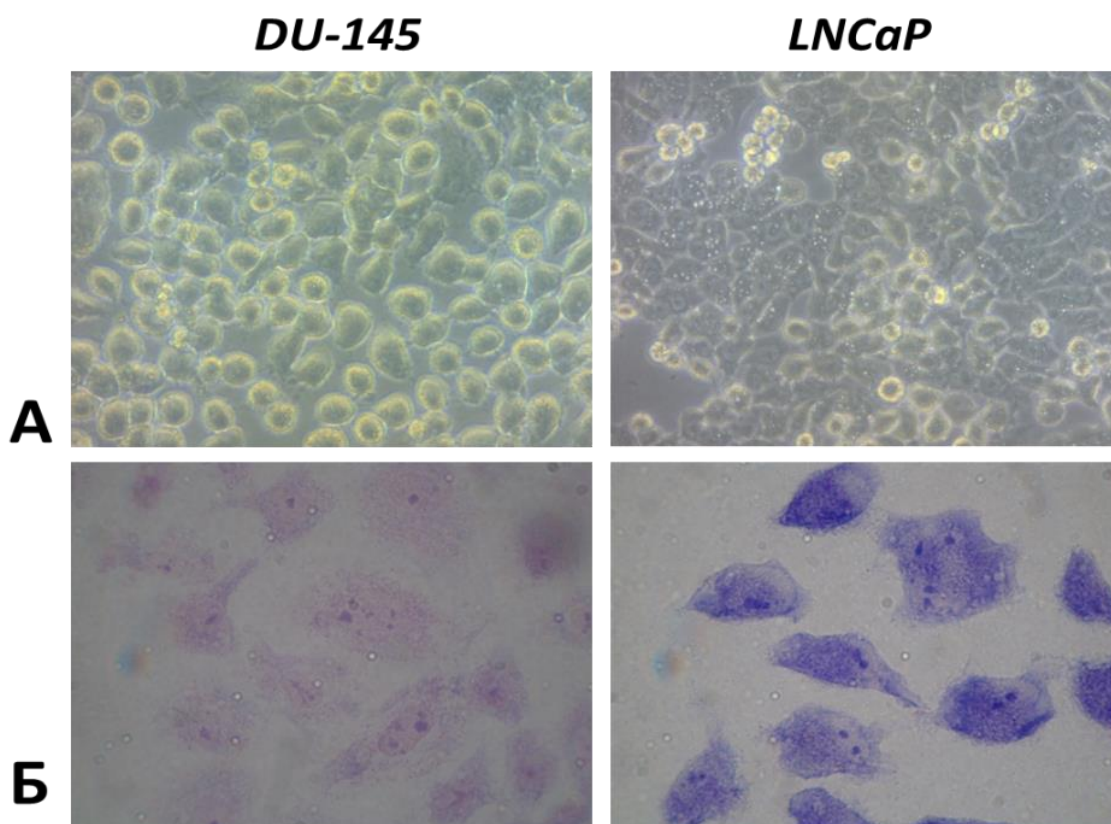


Рис. 3.1.1. Клітини ліній РПЗ людини: А – мікрофото живих клітин, $\times 900$;
Б – зафарбовування за Романовським, $\times 1000$

Поодинокі клітини зустрічаються часто, найменший розмір скупчень нараховує близько 2-6 клітин. Ядро округлої форми займає більше 40% об'єму клітин, в ньому чітко видно 2-3 ядерця. Культура LNCaP має тривалий час подвоєння кількості клітин (48-60 год), при утворенні 80% моношару клітини стають менш розпластаними.

Культура DU-145 представлена клітинами прямокутної, рідше веретеноподібної форми з виростами, які, по мірі росту, утворюють моно шар. Ядро правильної овальної форми, займає близько 35-40% об'єму клітин та містить 1-3 ядерця. Час подвоєння кількості клітин становить 30-40 год. По мірі росту клітини рівномірно займають площу культурального флакона. При утворенні 100% моношару клітини змінюють свою морфологію, стають більш округлими, у них зменшується кількість виростів, формується велика кількість вакуоль.

3.2.Фенотипові та молекулярно-біологічні ознаки клітинних ліній РПЗ різного ступеня злоякісності

Андрогенна промоція росту і прогресії РПЗ є загальновизнаною і підтверджується численними експериментальними та клінічними даними [140-143]. Проліферативна дія гормонів на епітеліоцити ПЗ здійснюється в нормі, а також при РПЗ, через AR та ER, однак, діють вони при цьому на різні структури. Для андрогенів основною тканиною-мішенню є епітелій, а для естрогенів – сполучна і м'язова тканинаПЗ [144].

Вважалося, що розвиток гормон-резистентності пов'язаний з втратою клітинами самих AR або їх функції з заміною андроген-залежної транскрипційної активності на альтернативні механізми [144]. Проте подальші молекулярні дослідження продемонстрували, що експресія AR зберігається на всіх стадіях розвитку первинної пухлини ПЗ і має місце більше ніж в 80% її гормон-резистентних форм [145], а також в метастазах [146]. Z. Culig і співавт. (1999) продемонстрували, що в клітинах первинної лінії LNCaP експресія AR

була в 4 рази менша, а їх транскрипційна активність в 30 разів, нижча, ніж у отриманих з них гормон-резистентних клітинах лінії LNCaP-abl.

Для андроген-рефрактерного РПЗ характерна гіперекспресія стромальних факторів росту і, невласлива нормальній залозі, здатність злоякісних епітеліальних клітин продукувати EGF, IGF-1, FGFb і деякі інші пептиди, внаслідок чого, епітелій набуває здатності до самостимуляції росту. На додаток до цього, порушуються й інші механізми сигнальної трансдукції – такі, як cAMP, протеїнкінази, модуляція андроген-опосередкованих шляхів, включаючи біосинтез стероїдів та порушення їх метаболізму, ампліфікація і мутації гена AR [144, 147]. Враховуючи зазначене, 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 (Martigel™).

Нами встановлено, що клітини ліній РПЗ людини (DU-145 та LNCaP) характеризувались наявністю рецепторів до стероїдних гормонів та HER2/neu (Табл. 3.2.1, Рис. 3.2.1). Високий рівень експресії AR встановлено як в клітинах лінії DU-145 - $282,0 \pm 14,0$ балів H-Score так і в лінії LNCaP ($270,0 \pm 8,0$ балів H-Score). В клітинах обох досліджуваних ліній відмічено високий рівень експресії ER β , низький 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).

Одну з основних ролей в процесах інвазії та метастазування відіграють молекули міжклітинної адгезії [148]. Вважається, що втрата міжклітинних «містків» і зв'язки з сусідніми епітеліальними клітинами є одним з перших етапів розвитку пухлини. Згідно даних літератури зниження експресії E-кадгерину часто спостерігається при РПЗ і може корелювати зі стадією захворювання, гістологічним типом пухлин та показниками виживаності хворих [149]. Отримані нами результати (Табл. 3.2.1) свідчать, що клітини обох

ліній РПЗ характеризуються низьким рівнем експресії Е-кадгерину. Ще однією важливою молекулою міжклітинної адгезії, дослідженням ролі якої приділяють значну увагу, є N-кадгерин. Цей глікопротеїн, згідно моделі, що була запропонована Friedl P. та Gilmour D (2009) може відповідати за підтримання контактів між пухлинними клітинами під час колективної міграції [150].

Таблиця 3.2.1

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
HER2/neu	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*

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

Експресія N-кадгерину у пухлинній тканині хворих на РПЗ асоціюється з наявністю метастазів та градацією за Глісоном [150]. У роботі Jennbacken K та співавт. при дослідженні впливу андрогенної депривації на експресію N-кадгерину в андроген-залежних (LNCaP) та андроген-рефрактерних клітинних лініях РПЗ (LNCaP-19 та PC-3) встановлено підвищення його експресії за умови відсутності андрогенів у культурі клітин LNCaP-19, але не в PC-3, що свідчить про можливе залучення AR в регуляцію рівнів N-кадгерину [151].

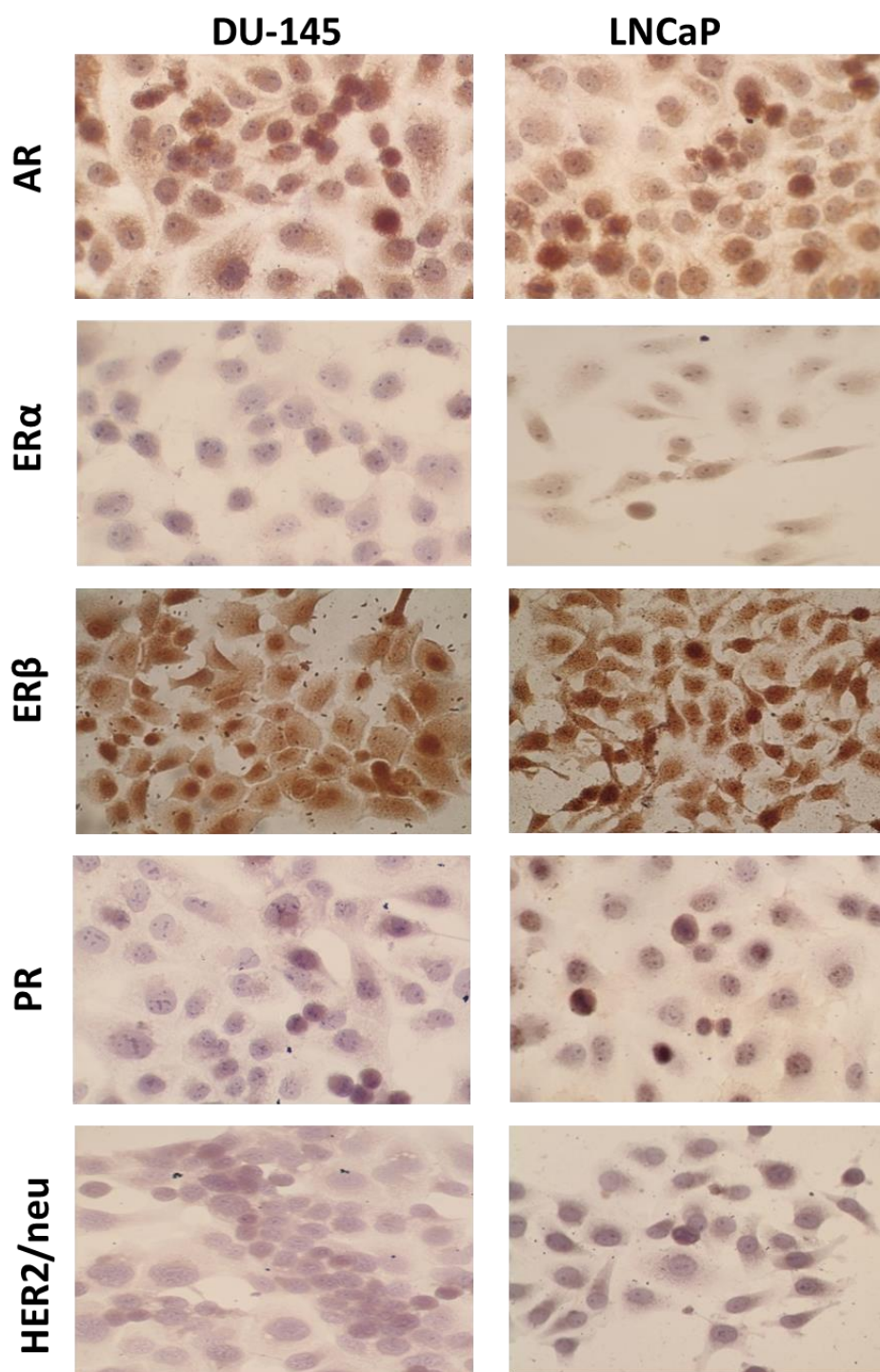


Рис. 3.2.1. Особливості експресії рецепторів стероїдних гормонів у клітинах ліній РПЗ людини різного. ІЦХ, дофарбування гематоксиліном Майєра, Зб. 400

Проведене нами дослідження експресії цієї адгезивної молекули продемонструвало, що її рівень в клітинах лінії DU-145 був на 41,1% нижчим у порівнянні з клітинами низького ступеня злоякісності лінії LNCaP ($175 \pm 12,7$ та $247 \pm 11,6$ бали H-Score, відповідно) (Табл. 3.2.1, Рис. 3.2.2).

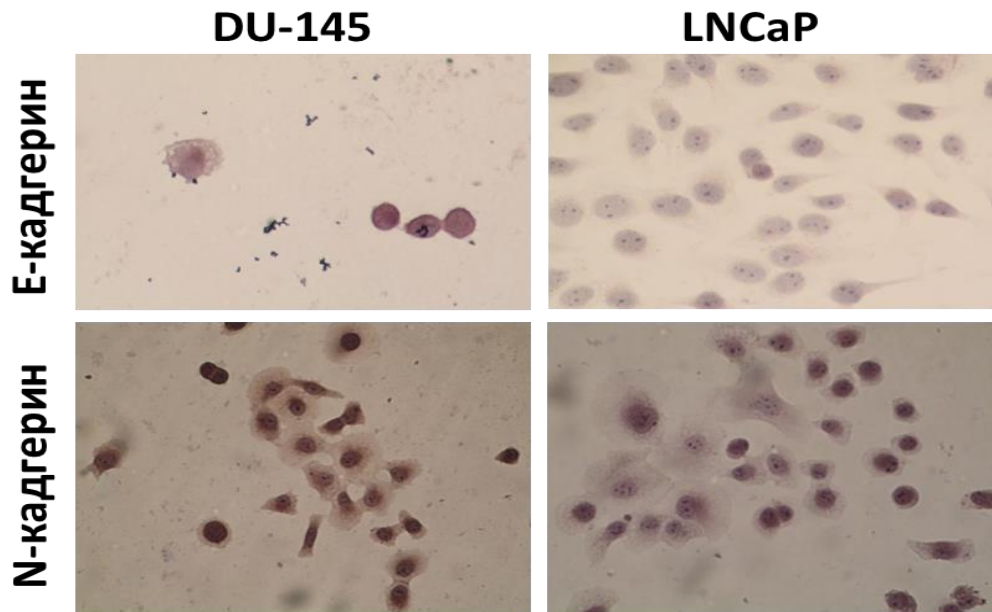


Рис. 3.2.2. Експресія молекул адгезії у клітинах ліній РПЗ людини. ІЦХ, дофарбування гематоксиліном Майєра, Зб. 400.

Відомо, що до ознак пухлинних клітин належить висока проліферативна та інвазивна активність. Оцінка даних показників є дуже важливою, як з точки зору біологічної характеристики, так і з огляду на можливість визначення прогнозу перебігу захворювання.

Нами встановлено, що клітини лінії DU-145 характеризувались значно вищою проліферативною (Ki-67 – $265,0 \pm 20,5$ балів за H-Score) та інвазивною активністю ($0,387 \times 10^3$ клітин), порівняно з клітинами лінії LNCaP, у яких рівень Ki-67 був нижчим та становив $174,0 \pm 24,6$ бали за H-Score, а показник інвазивної активності дорівнював $0,076 \times 10^3$ клітин (Табл. 3.2.1, Рис. 3.2.3 та Рис. 3.2.4.).

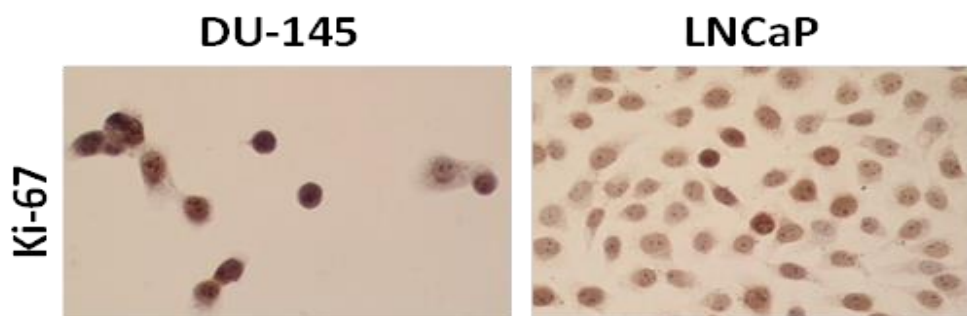


Рис. 3.2.3. Експресія маркера проліферації Ki-67 у клітинах ліній РПЗ людини ІЦХ, дофарбування гематоксиліном Майєра, Зб. 400

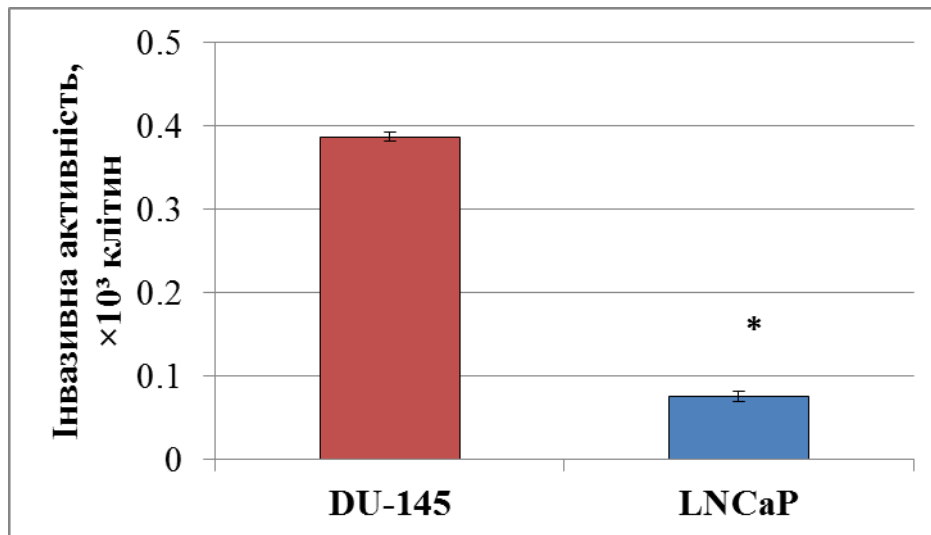


Рис.3.2.4. Інвазивна активність клітин РПЗ людини

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

Таким чином, проведені дослідження показали, 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.

3.3. Зв'язок експресії ЛФ і маркерів ПСК зі ступенем злоякісності клітин РПЗ

Згідно даних літератури, один із самостійних патогенетичних механізмів формування ступеня злоякісності, який не пов'язаний зі змінами активації транскрипційної функції AR, може бути пояснений виходячи з теорії існування ПСК [152]. Як уже зазначалось раніше, ПСК володіють широким спектром функціональних властивостей: вони регулюють виживання пухлинних клітин, метастатичний потенціал, стійкість до радіо- та хіміотерапії, сприяють виникненню рецидивів, а їх наявність в пухлинній тканині може вказувати на несприятливий прогноз перебігу захворювання [153]. З огляду на дані у літературі в якості маркерів ПСК в нашому дослідженні була вибрана комбінація з двох маркерів - $CD44^{+}CD24^{-/low}$.

Визначення експресії маркерів ПСК продемонструвало, що рівень експресії CD44 у клітинах РПЗ високого ступеня злоякісності становив $255,0 \pm 15,3$ балів H-Score, а CD24 – $20,0 \pm 5,6$ балів H-Score (Рис. 3.3.1). Клітини лінії LNCaP низького ступеня злоякісності характеризувалися низькими рівнями експресії CD44 та CD24 ($92,0 \pm 15,3$ та $12,0 \pm 4,0$ 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 ($CD44^{\text{high}}CD24^{\text{low}}$).

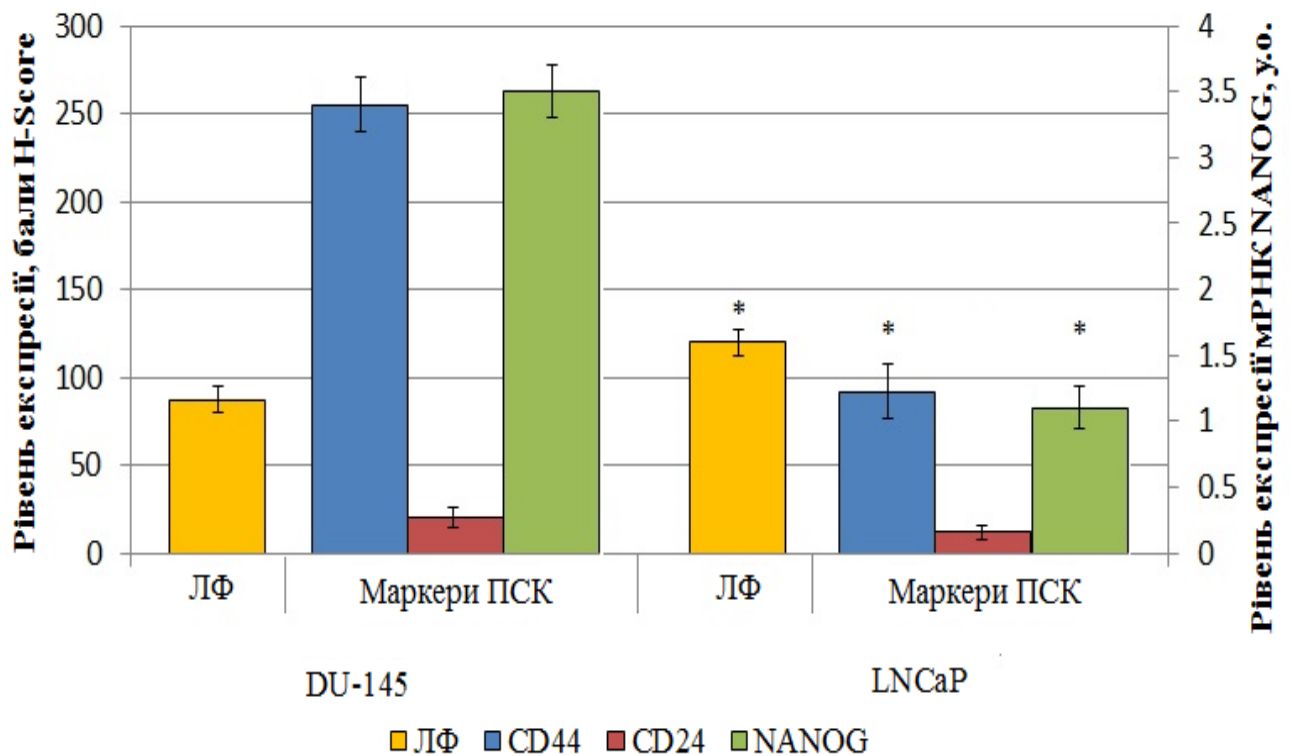


Рис. 3.3.1. Статус експресії маркерів ПСК, ЛФ та мРНК NANOG в клітинах ліній РПЗ людини

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 злоякісності 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 злоякісності 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

злаякісності клітин РПЗ людини асоціюється із наявністю клітин із фенотипом ПСК та низькими показниками експресії ЛФ.

3.4 Особливості експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності

При злоякісних захворюваннях ПЗ вагому роль у формуванні ступеня злоякісності відіграють епігенетичні зміни [154]. На сьогоднішній день відомо більше 30 генів, гіперметильованих при РПЗ. Ці гени контролюють клітинний цикл (APC, COX2, RASSF1A, CCND2), репарацію пошкодженої ДНК (MGMT, GSTP1), чутливість клітин до гормонів (MDR1), а також інвазію пухлинних клітин (CDH1, ANXA2) [103].

Згідно даних літератури, одним з механізмів формування ступеня злоякісності РПЗ може бути гіперметилування генів AR, результатом якого є "епігенетичне мовчання" [155], як це відбувається у випадку інактивації ER [156]. Ще однією важливою причиною агресивного перебігу РПЗ є дерегуляція експресії мікроРНК. Показано, що більше двох тисяч мікроРНК людини, здатні потенційно регулювати роботу сотень генів-мішеней. Ці молекули контролюють експресію генів на посттранскрипційному рівні, викликаючи деградацію мРНК-мішеней, або порушення трансляції і тим самим відіграють ключову роль у підтримці клітинного гомеостазу, регуляції клітинного циклу, диференціюванні, процесах апоптозу та інвазії, що може призводити до виникнення та прогресії злоякісних новоутворень може бути наслідком зміни рівня певних мікроРНК [154, 157].

В нормі андрогени регулюють експресію мікроРНК в тканині ПЗ, завдяки чому контролюється багато структурних та функціональних особливостей клітин [132, 158]. Наприклад, андроген викликає активацію експресії мікроРНК-141 в клітинах РПЗ *in vitro* та *in vivo* [159]. З урахуванням ролі мікроРНК в процесі пухлинної дисемінації [160], андроген-залежні зміни

профілю експресії мікроРНК клітинами РПЗ можуть мати значення в процесі формування ступеня злоякісності.

Специфічний регуляторний вплив стероїдів має дивергентний характер, так як опосередкований взаємодією однієї рецепторної молекули ($ER\alpha$, $ER\beta$ або AR) з промоторними регіонами багатьох генів мікроРНК. Крім того, така взаємодія може як активувати, так і пригнічувати транскрипцію генів мікроРНК. Відповідно до основної біологічної ролі мікроРНК, їх таргетний вплив на функції стероїдів опосередковується взаємодією з різними ділянками мРНК відповідних гормональних рецепторів і веде до пригнічення їх синтезу. В результаті дія багатьох мікроРНК конвергує на одній молекулі мРНК ($ER\alpha$, $ER\beta$ або AR) і в більшості випадків призводить до інгібування сигнального каскаду, що індукується стероїдними гормонами [161, 163].

Враховуючи важливе значення епігенетичної складової у формуванні ступеня злоякісності, 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 (Рис. 3.4.1, Табл.3.4.1), клітини високого ступеня злоякісності 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) порівняно з такими у клітинах LNCaP ($p<0,05$).

Ці дані узгоджуються із отриманими у роботах Zhang H.-L. et al. та Mishra S.. et al. які продемонстрували, що рівень miR-21 у пацієнтів з РПЗ був вищим при кастраційно-резистентному РПЗ високого ступеня злоякісності [79, 162]. Певні відмінності нами встановлено також при аналізі рівнів експресії онкосупресорних мікроРНК у клітинах РПЗ різного ступеня злоякісності. Показано, що клітини лінії DU-145 характеризувались зниженням у 1,6 рази рівня онкосупресорної мікроРНК-320 порівняно з такими у клітинах LNCaP ($p<0,05$).

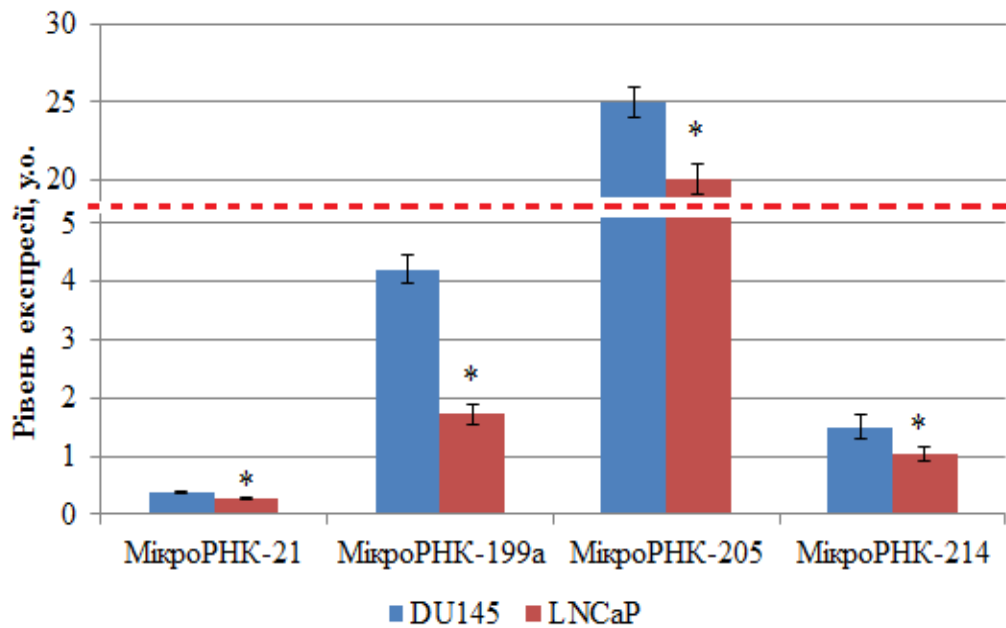


Рис. 3.4.1. Профіль експресії онкогенних мікроРНК у клітинах РПЗ різного ступеня злоякісності

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

Продемонстровано відсутність достовірних змін рівня онкосупресорних мікроРНК-let7 та -200b в клітинах РПЗ людини різного ступеня злоякісності(Рис. 3.4.2, Табл.3.4.1).

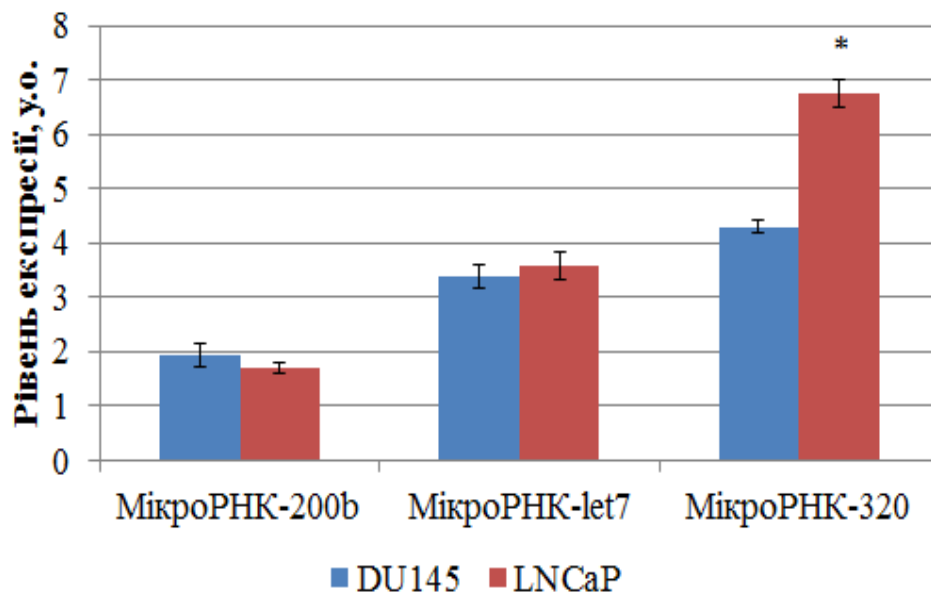


Рис.3.4.2. Профіль експресії онкосупресорних мікроРНК у клітинах РПЗ різного ступеня злоякісності

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

Отримані дані підтверджуються наявною в доступній нам літературі інформацією, зокрема встановлено, що значно вищі рівні експресії мікроРНК-199a і мікроРНК-34c характерні для клітин РПЗ, позитивних за маркерами ПСК-позитивних [164]. Що стосується мікроРНК-320, то її рівень був значно вищий в клітинах лінії LNCaP, що може бути пов'язано із збільшенням β -катеніну.

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено профіль експресії мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини з різним ступенем злоякісності (Табл. 3.4.1). Визначено, що характерною ознакою клітин РПЗ людини високого ступеня злоякісності є підвищення рівнів експресії таких онкогенних мікроРНК як мікроРНК-214, -21, -199a та 205. Продемонстровано, що клітини РПЗ людини низького ступеня злоякісності лінії LNCaP характеризуються високим рівнем експресії онкосупресорної мікроРНК-320.

Таблиця 3.4.1

Профіль експресії онкогенних та онкосупресорних мікроРНК у клітинах ліній РПЗ людини різного ступеня злоякісності.

LNCaP	DU-145
Онкогенні мікроРНК	
214↓, 21↓, 199a↓, 205↓	214↑, 21↑, 199a↑, 205↑
Онкосупресорні мікроРНК	
320↑, 2006(=), let7(=)	320↓, 2006(=), let7(=)

↓ – Рівень експресії мікроРНК нижчий порівняно з клітинами РПЗ людини високого ступеня злоякісності

↑ – Рівень експресії мікроРНК вищий порівняно з клітинами РПЗ людини низького ступеня злоякісності

(=) – Рівень експресії не залежить від ступеня злоякісності клітин РПЗ

Підсумки. Встановлено, що клітинні лінії РПЗ людини різного ступеня злоякісності характеризувались наявністю рецепторів до стероїдних гормонів (AR, ER α , ER β та середній рівень PR) та HER2/neu.

В клітинах РПЗ людини високого ступеня злоякісності лінії DU-145 визначався достовірно менший рівень експресії N-кадгерину ($p < 0,05$), в той час як експресія CD44 була більшою у 2,8 разу ($p < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками у лінії LNCaP.

Визначено, що клітини РПЗ людини високого ступеня злоякісності лінії DU-145 також характеризувались значно вищою проліферативною та інвазивною активністю порівняно з клітинами лінії LNCaP.

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 досліджень, викладені у Розділі 3, опубліковані у наступних роботах: 165-171.

РОЗДІЛ 4.

ЗВ'ЯЗОК ЕКСПРЕСІЇ ЛФ З КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИМИ ОСОБЛИВОСТЯМИ РПЗ ТА ПОКАЗНИКАМИ БЕЗРЕЦИДИВНОЇ ВИЖИВАНOSTІ ХВОРИХ

Згідно результатів досліджень останніх років, велике значення надається розширенню знань щодо ролі залізовмісних білків у злоякісній трансформації та пухлинній прогресії [172-175]. Серед залізовмісних білків найменш дослідженим при розвитку і прогресії РПЗ є ЛФ. Інтерес до його вивчення при РПЗ обумовлений тим, що ця залоза є одним з найбільших ЛФ-синтезуючих органів у чоловіків. Сьогодні відомо, що на різних етапах розвитку багатьох онкологічних захворювань в організмі відбувається порушення експресії ЛФ [176]. Це може бути пов'язано зі зміною цитокінового профілю пухлини і її здатності як самостійно синтезувати цей білок, так і впливати на його продукцію в інших тканинах і клітинах [177]. Проте, роль ЛФ як прогностичного маркеру РПЗ до цього часу не з'ясована. З огляду на це, метою даного фрагменту роботи було дослідження зв'язку експресії ЛФ зі ступенем розповсюдженості РПЗ та показниками безрецидивної виживаності хворих.

4.1.Топологія експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих на РПЗ

Про різний характер експресії ЛФ у пухлинній тканині повідомлялося при його вивченні у тканині раку молочної та щитовидної залоз, шлунка, товстої та прямої кишки, жовчного міхура, астроцитоми та мультиформної гліобластоми, шкіри, ендометрію і нирок [178]. В доступній нам літературі існують лише поодинокі та досить суперечливі відомості про особливості експресії ЛФ у хворих на РПЗ. Зокрема, було показано, що високий рівень експресії ЛФ спостерігається в тканині умовно нормальної ПЗ, тоді як при розвитку доброякісних або злоякісних новоутворень цей залізовмісний білок

експресується лише окремими клітинами або й взагалі не детектується [179]. Все вище наведене свідчить про те, що всебічне вивчення змін експресії ЛФ у пухлинному осередку залежно від особливостей загальної будови та архітекτονіки новоутворень є важливим для персоналізованого здійснення прогнозу захворювання.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження показав значну варіабельність розташування клітин, які експресували ЛФ, навіть у пухлинах однакової гістологічної структури та ступеня диференціювання. Позитивна реакція з антитілами до ЛФ визначалась у вигляді коричневого забарвленнями цитоплазми різного ступеня інтенсивності (від світло- до темнокоричневого). Експресія ЛФ спостерігалась у більшості збережених залозистих клітин та в поодиноких або невеликих групах пухлинних клітин. Зазначимо, що найчастіше локалізація цього глікопротеїну відмічалась у апікальній зоні клітини. Звертає на себе увагу і той факт, що експресія ЛФ детектувалась саме в клітинах, які знаходилися на межі люмінального простору або ж контактували з інтралюмінальними включеннями (Рис. 4.1.1). Поряд з цим, експресія ЛФ визначалась у клітинах, які знаходились в люмінальному просвіті залоз, невеликих люмінальних тільцях (можуть бути дуже ранніми формами *corpora amylace*), а також в інтралюмінальному секреті (Рис. 4.1.2).

Позитивна імуногістохімічна реакція з антитілами проти ЛФ також спостерігалась з *corpora amylace*, які зазвичай мали округлу форму (Рис. 5.2.3). Зауважимо, що у переважна більшість тілець *corpora amylace* характеризувались однорідним імунофарбуванням (Рис. 5.2.3, А, В). В окремих випадках виявлено пошарове забарвлення цих утворень (Рис. 5.2.3, Б), що може свідчити про неоднорідність їх структури та циклічність процесів літогенезу у ПЗ. Варто зазначити, що наявність інтралюмінальних включень в тканині ПЗ, таких як *corpora amylace* чи простатоліти, асоційована з наявністю вогнищ хронічного запалення, які не лише створюють умови для розвитку неоплазії, а й можуть призводити до пухлинної прогресії та метастатичного поширення [34, 180].

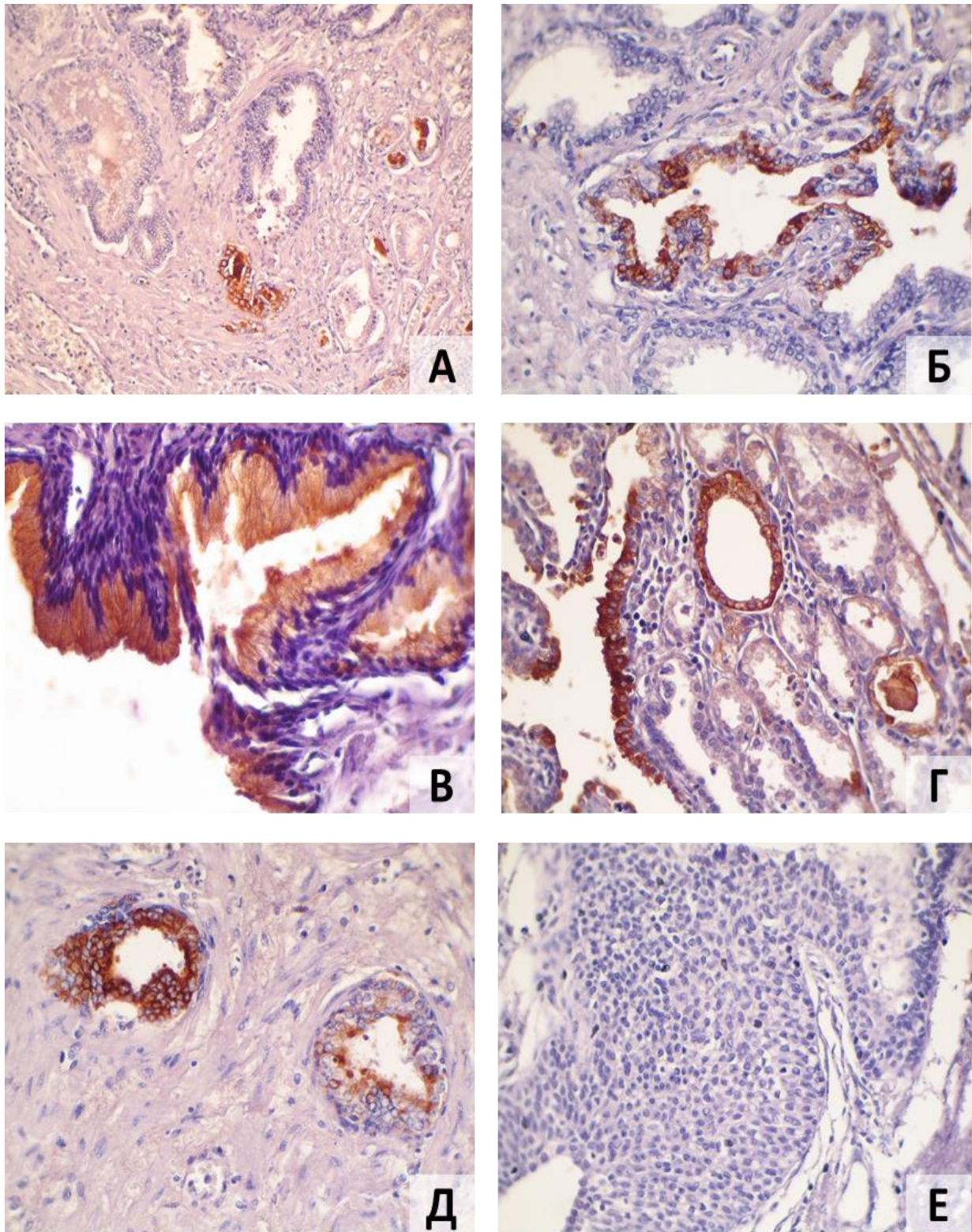


Рис. 4.1.1. Топологія експресії ЛФу тканині РПЗ: А, Б – в поодиноких пухлинних клітинах; В – в апікальній частині клітин; Г – в збережених залозистих клітинах; Д – в клітинах на межі люмінального простору Е – відсутність експресії. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Гілла. Зб. $\times 400$.

Отримані нами результати узгоджуються з даними Sfanos K.S.etal., що виявили наявність ЛФ у зазначених структурах з використанням Вестерн-блот аналізу [180].

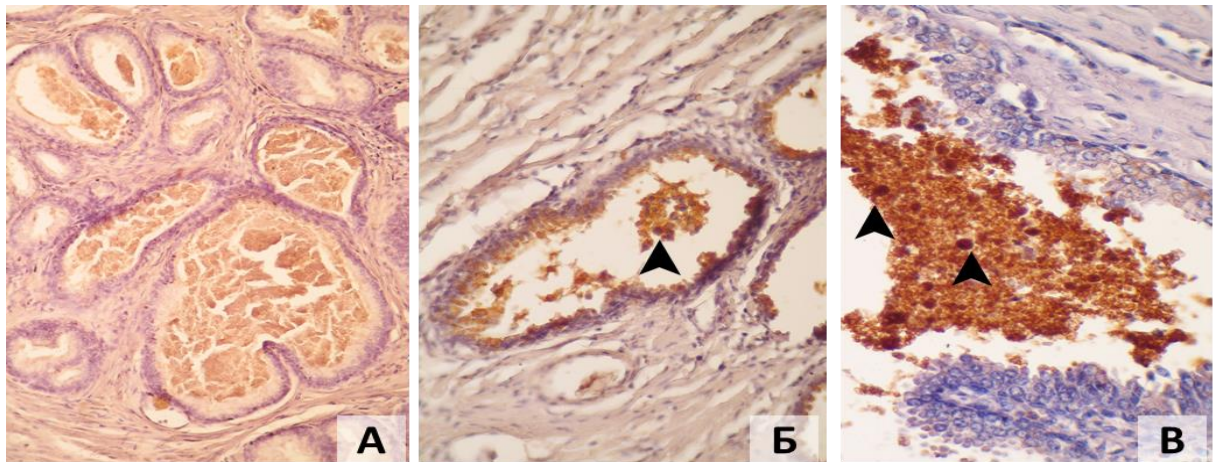


Рис. 4.1.2. Топологія експресії ЛФу тканині РПЗ: А – в інтралюмінальному секреті Зб. $\times 100$; Б – в клітинах люмінального простору. Зб. $\times 100$; В – в інтралюмінальних тільцях оточених інфільтратом. Зб. $\times 200$. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Гілла.

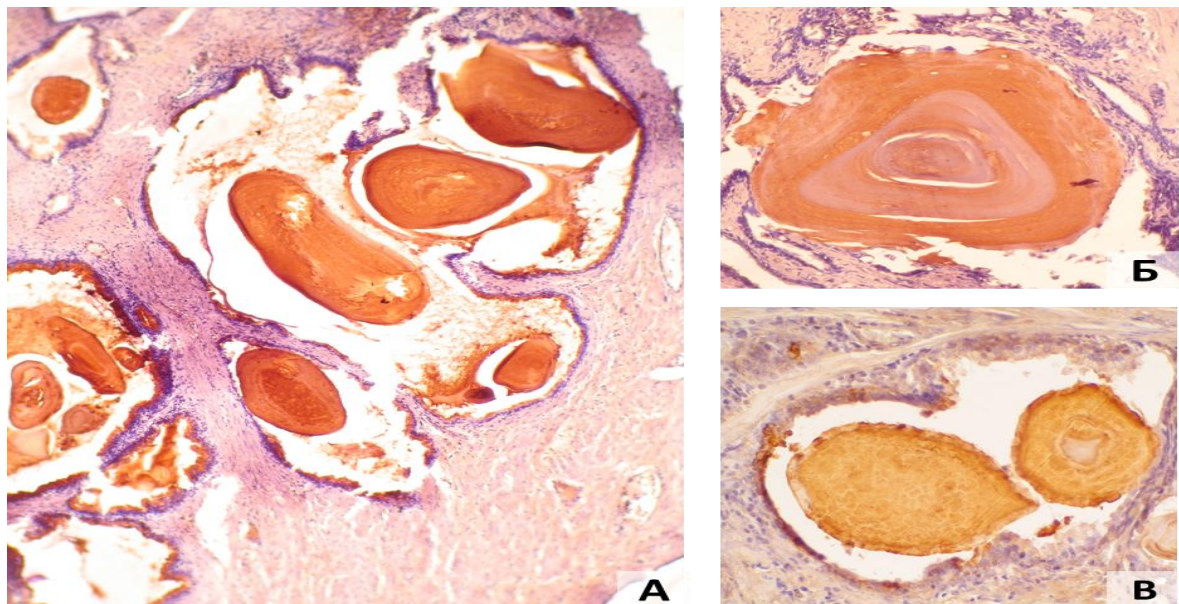


Рис. 4.1.3. Експресія ЛФ в *corpora atylase* тканини РПЗ: А – Зб. $\times 100$; Б, В – Зб. $\times 200$. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Гілла.

З огляду на те, що ЛФ є одним з основних білків системи вродженого імунітету та синтезується імунними клітинами, то його експресію спостерігали в нейтрофілах, які інфільтрують пухлину, навколо судин, а також, ймовірно, у тканинних макрофагах [181, 182] (Рис. 4.1.4).

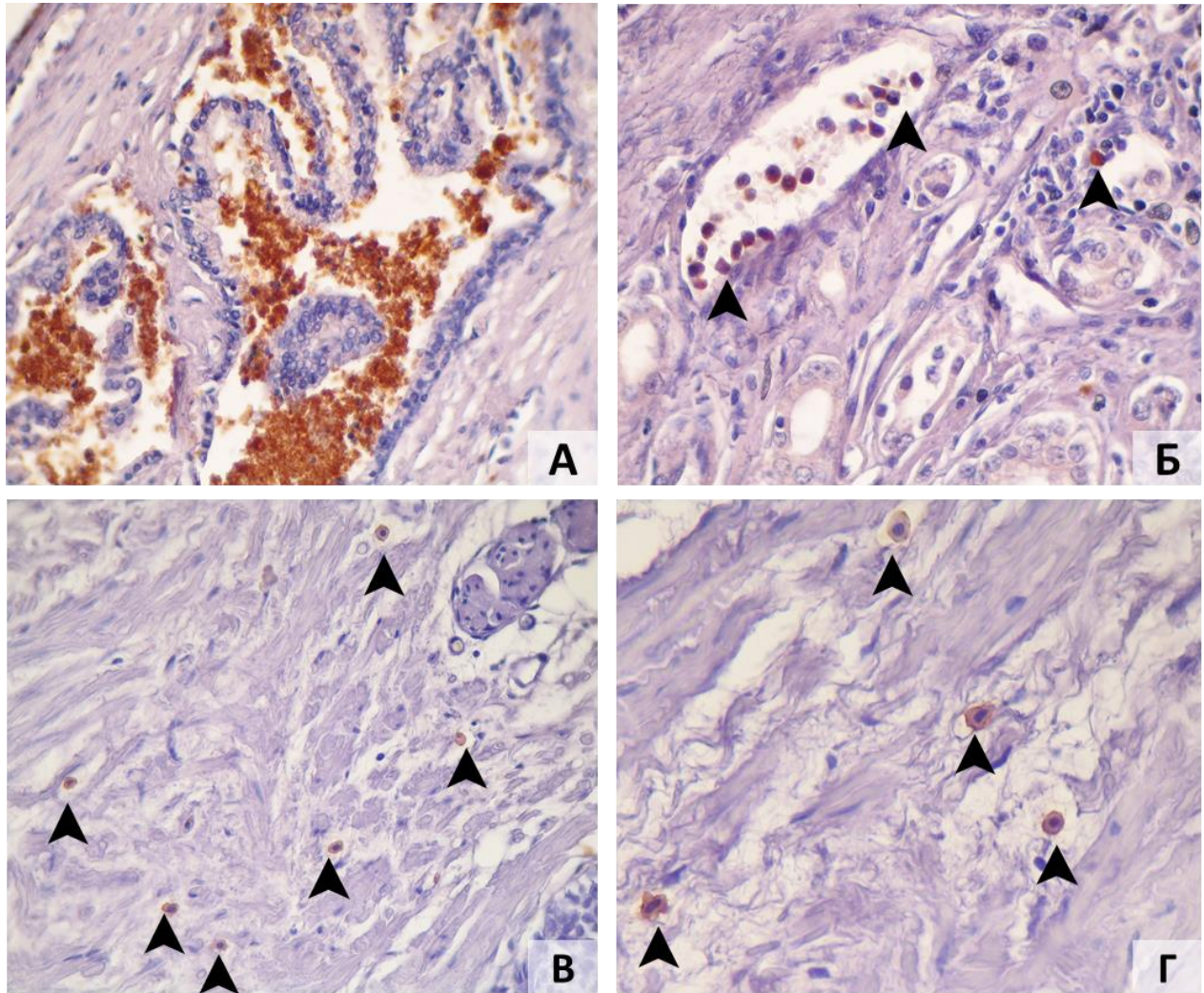


Рис. 4.1.4. Топологія експресії ЛФ у тканині РПЗ: А – у нейтрофілах, Зб. $\times 200$; Б – у нейтрофілах кровоносної судини, Зб. $\times 400$; В, Г – у макрофагах, Зб. $\times 200$; Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Гілла.

Наведене свідчить про варіабельний характер експресії ЛФ у клітинах різних морфологічних структур РПЗ, що стало підґрунтям для проведення кількісної оцінки показників експресії зазначеного протеїну та дослідження його зв'язку з клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ.

4.2. Кількісна оцінка експресії ЛФ в тканині РПЗ

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження показав високий рівень експресії ЛФ в умовно здоровій тканині ПЗ (вилучена при оперативному втручанні у хворих з раком сечового міхура). Вивчення кількісних показників експресії ЛФ показало, що клітини РПЗ характеризувалися низьким рівнем цього протеїну, який визначався у 63,3% досліджених випадків. Зокрема, у немалігнізованій тканині рівень ЛФ становив $257,0 \pm 15,6$ балів H-Score, з індивідуальними коливаннями від 210 до 290 балів H-Score. Показники експресії ЛФ у клітинах РПЗ були в 3,4 рази меншими і складали $76,2 \pm 9,8$ балів H-Score, з індивідуальними коливаннями від 0 до 135 балів H-Score (Рис. 4.2.1).

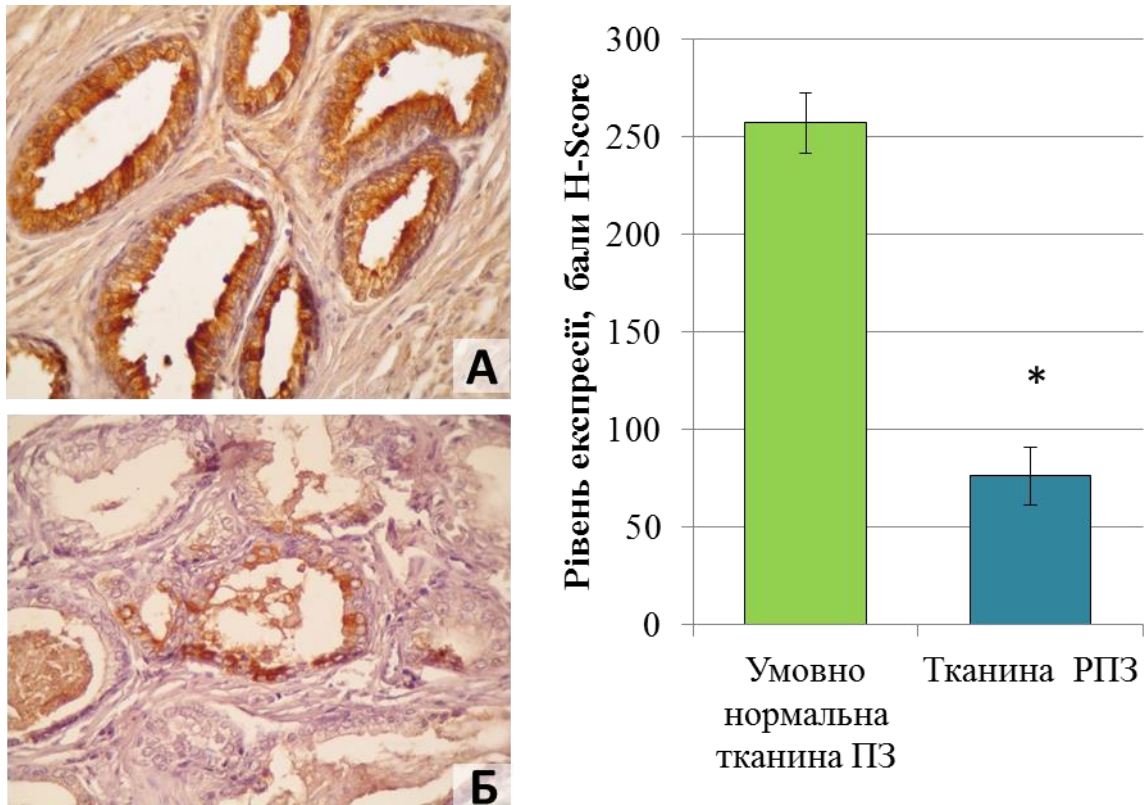


Рис. 4.2.1. Експресія лактоферину в умовно нормальній (А) та злоякісно трансформованій (Б) тканині ПЗ. Зб. $\times 200$. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Майєра.

Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні з умовно нормальною тканиною ПЗ

Отримані нами результати щодо рівня експресії ЛФ у тканині РПЗ, узгоджуються із отриманими у дослідженні *vanSandem, 1981* [26, 27].

До критеріїв, які мають суттєве клінічне значення для визначення агресивності пухлинного процесу відноситься стадія РПЗ. Встановлено, що зі зростанням стадії РПЗ відбувається зниження рівня експресії ЛФ в пухлинній тканині. Так найвищий показник ЛФ був у групі хворих з II стадією і становив $103,3 \pm 9,8$ бали H-Score, що в 1,4 та 1,8 раза вище у порівнянні з пацієнтами із III та IV стадією відповідно (Рис.4.2.2).

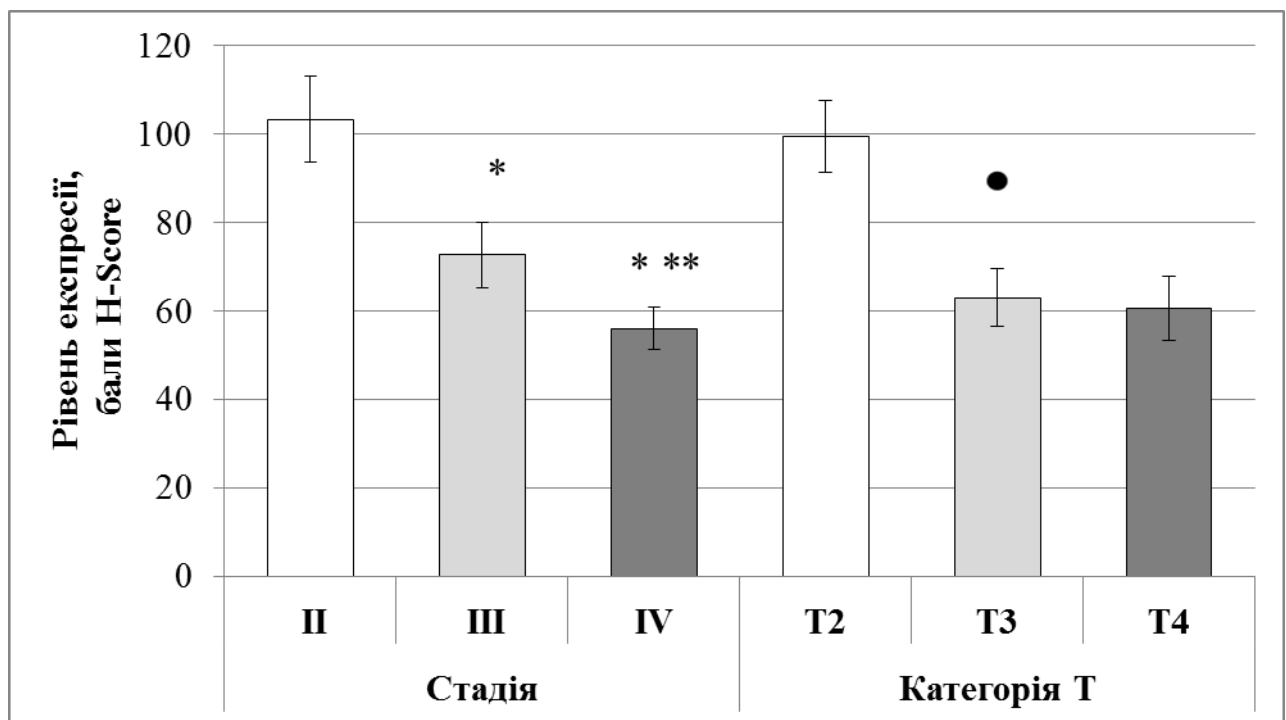


Рис. 4.2.2. Залежність рівня експресії ЛФ у клітинах від стадії РПЗ та категорії T

Примітки: * – $p < 0,05$ у порівнянні з II стадією РПЗ; ** – $p < 0,05$ у порівнянні з III стадією РПЗ; • – $p < 0,05$ у порівнянні з T2 категорією.

Дослідження залежності експресії ЛФ категорії T виявило, що у хворих із пухлинами T2 його середній рівень був достовірно вищим і становив $99,4 \pm 8,2$ бали H-Score, порівняно з пацієнтами із T3 та T4 новоутвореннями РПЗ ($57,0 \pm 9,5$ та $60,6 \pm 7,3$ бали H-Score, відповідно).

Виявлено обернену залежність між експресією ЛФ у пухлинній тканині та наявністю метастазів у РЛВ. Так, у хворих з метастазами в лімфатичних вузлах рівень експресії ЛФ в пухлинній тканині РПЗ становив $63,6 \pm 7,3$ бали H-Score, що в 1,4 рази нижче ніж у хворих без метастазів ($92,0 \pm 10,0$ бали H-Score).

На рівні тенденції відмічено зв'язок показників експресії ЛФ із ступенем диференціювання РПЗ. Зокрема, дещо вищий рівень ЛФ був встановлений у новоутвореннях з сумою балів за Глісоном < 7 ($80,5 \pm 8,0$ балів H-Score) порівняно з новоутвореннями сума балів за Глісоном у яких становила ≥ 7 ($69,3 \pm 6,6$ бали H-Score) (Рис. 4.2.3).

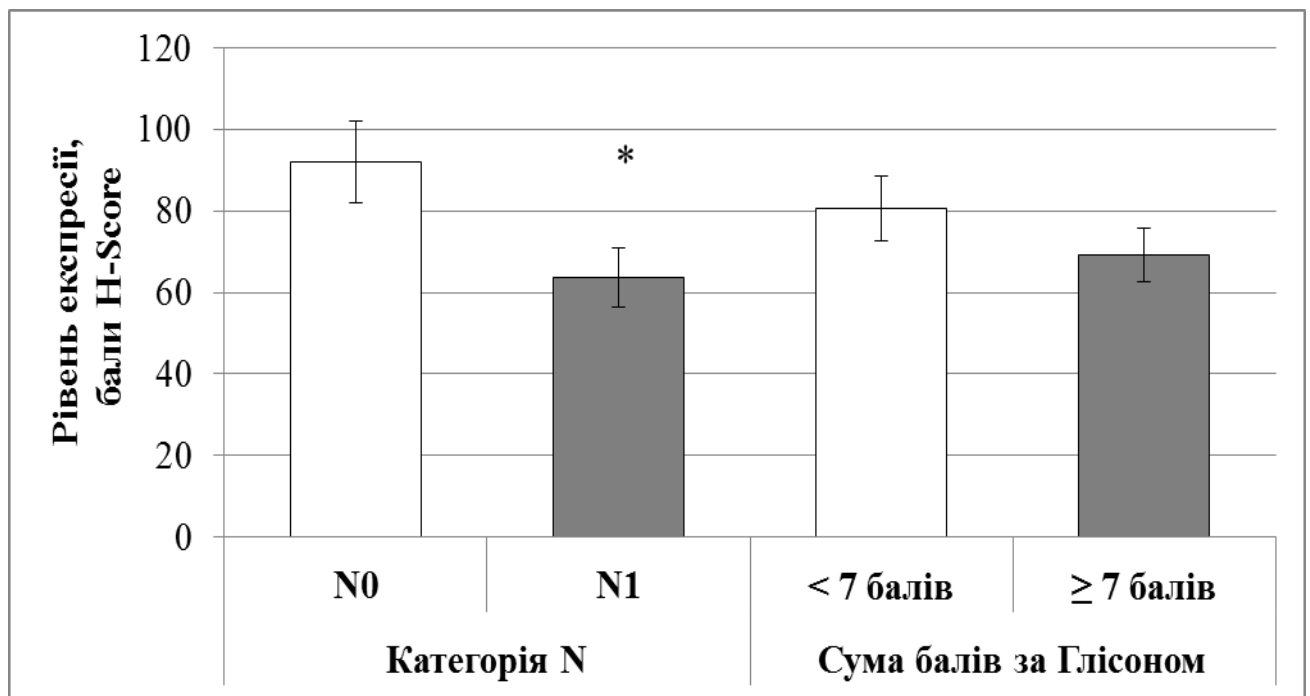


Рис. 4.2.3. Залежність рівня експресії ЛФ у клітинах РПЗ від наявності метастатичного ураження РЛВ та ступеня диференціювання новоутворень

Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні з групою хворих без метастазів

Визначено, що високі показники ПСА у сироватці крові хворих на РПЗ асоціювалися зі зниженням рівня експресії ЛФ у пухлинних клітинах. Так, у пацієнтів із концентрацією ПСА меншою ніж 10 нг/мл, рівень експресії ЛФ був у 2,0 рази вищим у порівнянні з хворими із рівнем ПСА більшим 10 нг/мл ($p < 0,05$) (Рис. 4.2.4).

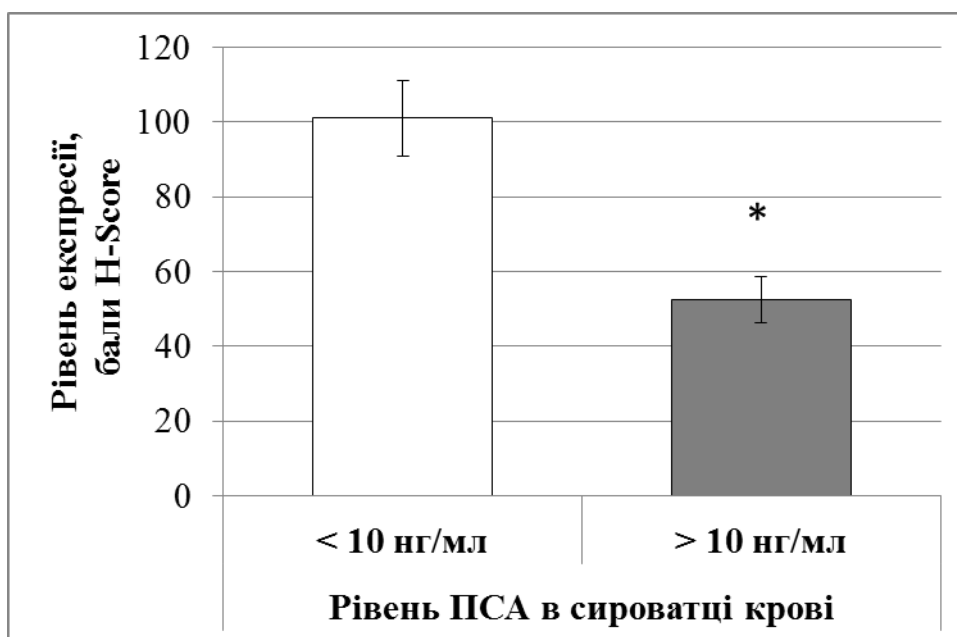


Рис. 4.2.4. Залежність рівня експресії ЛФ у клітинах РПЗ від концентрації ПСА в сироватці крові хворих

Примітка. * – $p < 0,05$ у порівнянні з хворих із рівнем ПСА < 10 нг/мл.

Встановлені відмінності у показниках експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих з різними клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу стали підґрунтям для проведення кореляційного аналізу, результати якого подані в Табл. 4.2.1.

Таблиця 4.2.1

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

Пари кореляцій		Коефіцієнт кореляції, ρ
Стадія	Рівень експресії ЛФ	-0,55 ($p < 0,05$)
Категорія Т за TNM		-0,48 ($p < 0,05$)
Категорія N за TNM		-0,52 ($p < 0,05$)
Сума балів за Глісоном		-0,18 ($p > 0,05$)
Рівень ПСА		-0,39 ($p < 0,05$)

Як видно з наведених даних, нами продемонстровано існування оберненого кореляційного зв'язку між рівнем експресії ЛФ в пухлинній тканині та такими клініко-патологічними характеристиками РПЗ як стадія захворювання, розмір пухлини, наявність метастазів в РЛВ та рівень ПСА в сироватці крові хворих.

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ЛФ з зазначеними вище показниками агресивності пухлинного процесу, було проаналізовано безрецидивну виживаність хворих на РПЗ з урахуванням показників експресії зазначеного маркера. Як видно з наведених даних, достовірне зниження показників дворічної безрецидивної виживаності на 22 % встановлено у хворих з відсутністю експресії ЛФ у тканині РПЗ ($p < 0,05$) (Рис. 4.2.5.).

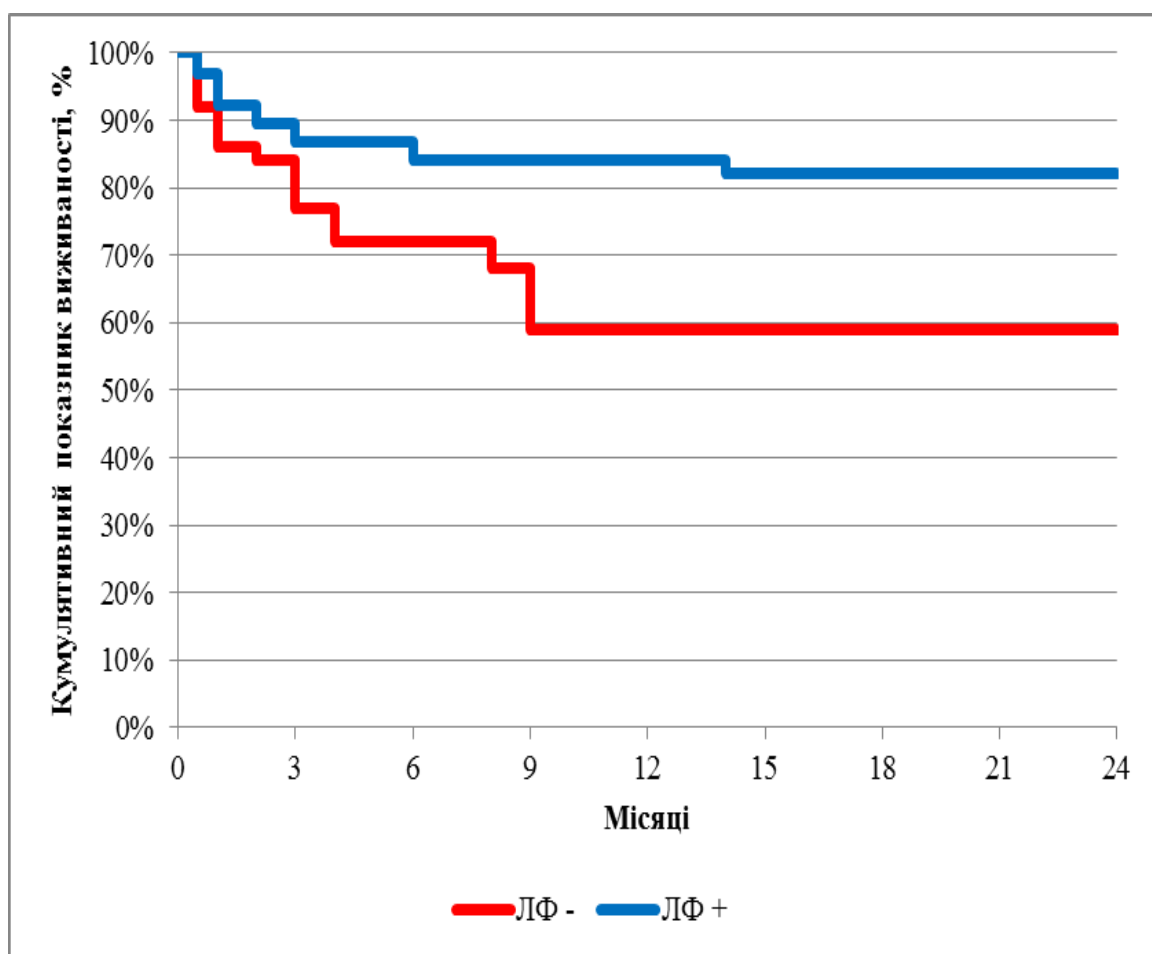


Рис. 4.2.5. Безрецидивна виживаність хворих залежно від наявності експресії ЛФ у тканині РПЗ за методом Каплана–Мейєра (log-ranktest)

Підсумки. Встановлено варіабельний характер експресії ЛФ в клітинах різних морфологічних структур ПЗ. Показано зниження рівня експресії ЛФ в тканині РПЗ в 3,4 рази порівняно з умовно нормальною тканиною ПЗ.

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 характеризувалися низьким рівнем цього протеїну, який визначався у 63,3% досліджених випадків. Продемонстровано, що рівень експресії ЛФ у тканині РПЗ корелює з такими клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу як стадія захворювання, розмір пухлини, наявність метастазів в РЛВ та рівень ПСА в сироватці крові хворих.

Результати досліджень, викладені у Розділі 4, опубліковані у наступних роботах:183-192

РОЗДІЛ 5.

ОЦІНКА КЛІНІЧНОГО ЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ МАРКЕРІВ ПСК ТА РІВНЯ мРНК NANOG У ПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ ДЛЯ ПРОГНОЗУВАННЯ АГРЕСИВНОСТІ ПЕРЕБІГУ РПЗ

5.1. Зв'язок між наявністю ПСК і рівнем мРНК NANOG 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 (Рис. 5.1.1.).

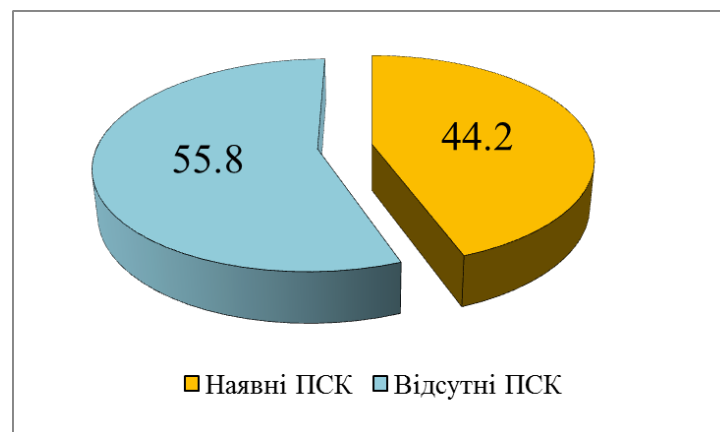


Рис. 5.1.1. Розподіл хворих на РПЗ за частотою експресії маркерів ПСК в тканині РПЗ

Експресія CD44 (синій колір) визначалась виключно на плазматичній мембрані клітин РПЗ, у той час як експресія CD24 – як на клітинній мембрані, так і в цитоплазмі клітин РПЗ (червоний колір) (Рис. 5.1.2).

При аналізі залежності між наявністю ПСК у пухлинній тканині та клініко-патологічними особливостями РПЗ найбільшу частоту клітин із фенотипом ПСК виявлено у пацієнтів з РПЗ IV стадії (61,1 % випадків) порівняно із хворими із II та III стадією пухлинного процесу (34,3% та 56,3% випадків відповідно) (Рис. 5.1.3).

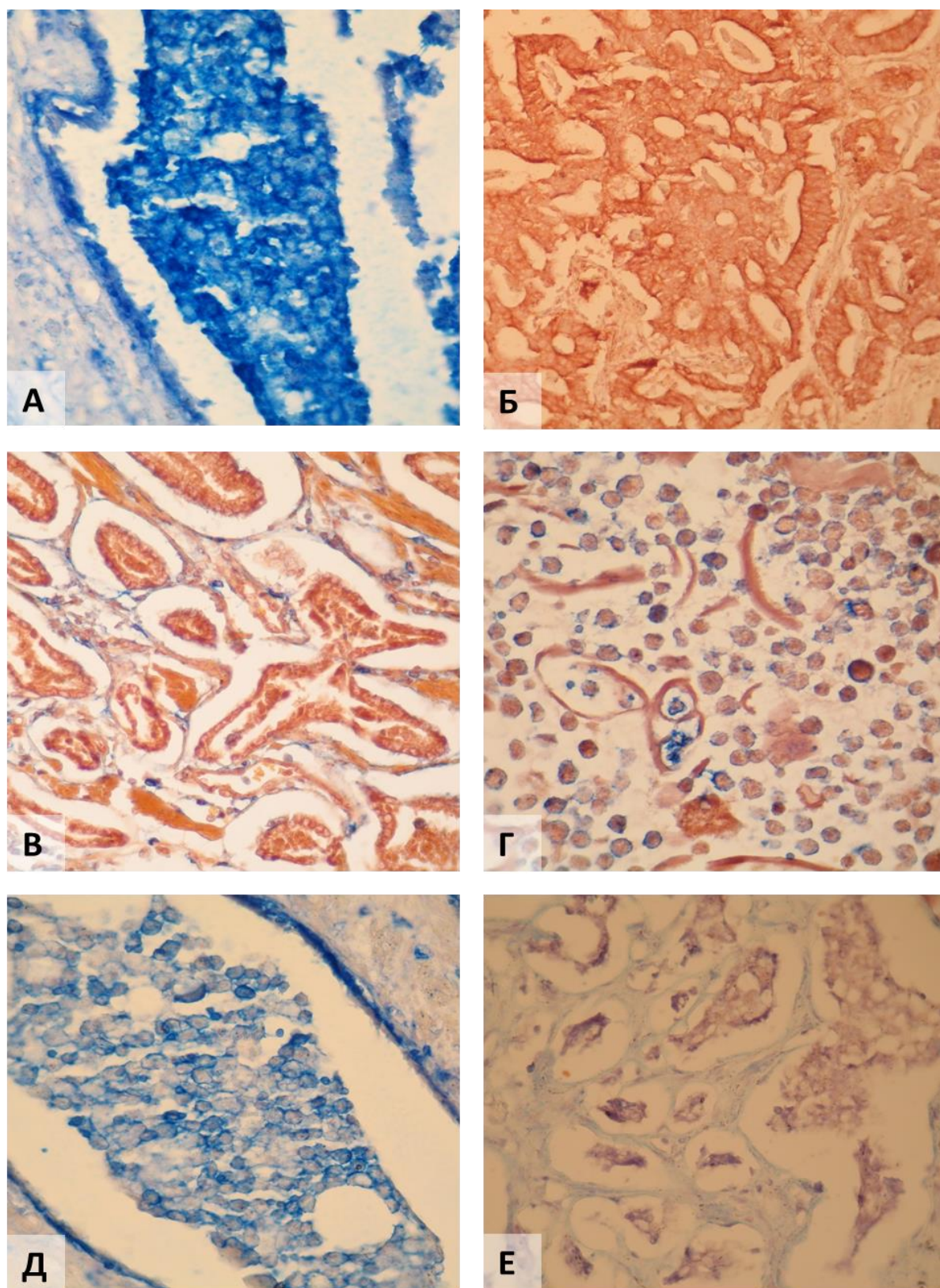


Рис. 5.1.2. Особливості експресії маркерів ПСК у тканині РПЗ. А – CD44 позитивний контроль, Б – CD24 позитивний контроль, В – CD44^{-low} CD24^{+high}, Г – CD44^{high} CD24^{high}, Д – CD44^{+high} CD24^{-low}, Е – CD44^{-low} CD24^{-low}. Експресія маркерів ПСК: CD44 (синій) та CD24 (червоний). Подвійна мітка. Імуногістохімія. Зб. $\times 400$.

Продemonстровано достовірне підвищення кількості пухлин з фенотипом $CD44^+CD24^{-low}$ із зростанням категорії Т (Рис. 5.1.3). Найбільшу кількість ПСК-позитивних пухлин (72,7 % випадків) виявлено у хворих з новоутвореннями, що проростали в навколишні тканини та органи. Наявність ПСК була зафіксована у 52,8% випадків пухлин, які поширювалися за межі капсули ПЗ, що у 1,5 більше порівняно з новоутвореннями обмеженими ПЗ (35,6%). Потрібно відзначити і той факт, що метастази в РЛВ частіше діагностувались у хворих з наявністю ПСК Рис.5.1.3.

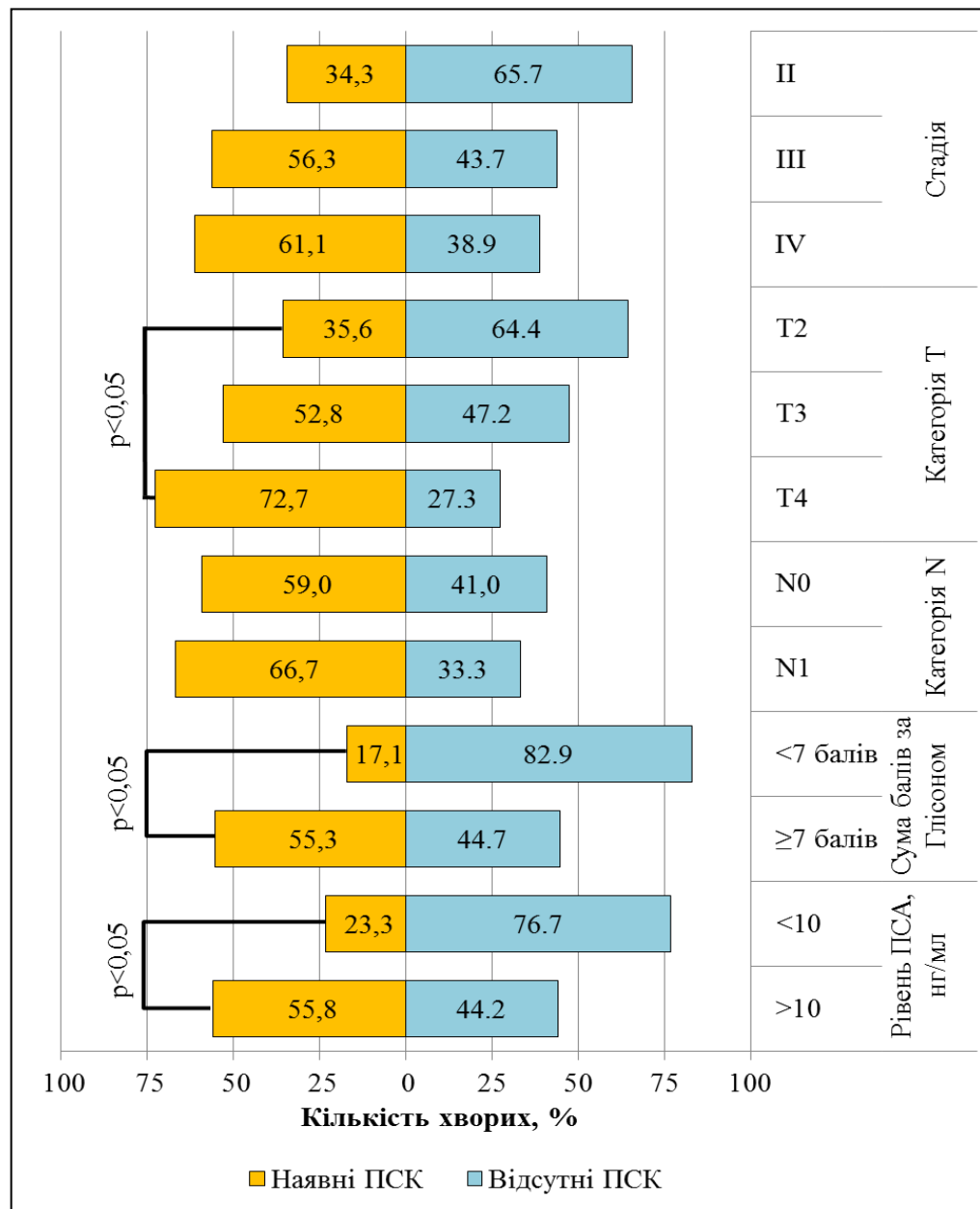


Рис. 5.1.3. Зв'язок між статусом ПСК з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ.

Встановлено, що наявність маркерів ПСК асоціюється з низьким ступенем диференціювання РПЗ. Зокрема, найбільшу частоту клітин із фенотипом ПСК ідентифіковано в пухлинах в яких визначався високий індекс Глісона (55,3 % випадків) порівняно із новоутвореннями з сумою балів за Глісоном ≥ 7 (17,1% випадків) (Рис. 5.1.3.).

Показано, що наявність клітин з фенотипом ПСК виявлялася у новоутвореннях РПЗ за наявності високого доопераційного рівня ПСА в сироватці крові хворих (55,8 % випадків).

На наступному етапі нами досліджено особливості експресії мРНК NANOG в пухлинній тканині хворих на РПЗ. Аналіз рівня мРНК NANOG в пухлинній тканині хворих на РПЗ показав, що цей показник характеризувався значною варіабельністю, про що свідчать індивідуальні коливання від $0,11 \pm 0,03$ у.о. до $15,24 \pm 0,36$ у.о. Середній рівень експресії мРНК NANOG у пухлинних клітинах хворих загальної групи становив $4,18 \pm 0,65$ у.о.

З метою визначення ролі цього онкогену у формуванні ступеня злоякісності РПЗ, на основі проведеного аналізу розподілу відносних частот досліджуваних варіант, усіх хворих було розподілено на 2 групи залежно від рівнів мРНК NANOG. Першу групу склали 58 хворих, що мали рівень мРНК NANOG менше 4 у.о., а другу групу – 62 хворих з рівнем мРНК NANOG вищим за 4 у.о. Середній рівень мРНК NANOG в 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 у другій групі був у 4,09 рази 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. (Табл. 5.1.1).

На наступному етапі нами було проведено аналіз залежності рівня мРНК NANOG від клініко-патологічних показників пацієнтів обох досліджуваних груп. Як було зазначено раніше, концентрація ПСА до лікування розглядається як один з факторів прогнозування агресивності перебігу захворювання та корелює з показниками безрецидивної виживаності хворих [193]. З огляду на це, на наступному етапі нашої роботи проведено вивчення залежності експресії мРНК NANOG від рівня ПСА в сироватці крові. Виявлено, що у пацієнтів обох

досліджуваних груп підвищення до операційної концентрації ПСА в сироватці крові асоціюється з високими показниками мРНК NANOG в пухлинній тканині (Табл.5.1.1). Так у хворих 1 та 2 групи з рівнем ПСА меншим 10 нг/мл показник мРНК NANOG становив $1,52 \pm 0,18$ у.о. та $6,11 \pm 0,54$ у.о., відповідно, в той час як у пацієнтів із рівнем ПСА більшим 10 нг/мл аналогічні показники дорівнювали $2,97 \pm 0,12$ у.о. та $11,07 \pm 1,72$ у.о., відповідно.

Таблиця 5.1.1

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

Показник	Група хворих № 1 (Рівень мРНК NANOG < 4у.о.)		Група хворих № 2 (Рівень мРНК NANOG > 4у.о.)	
	Кількість хворих, n/%	Рівень мРНК NANOG, у.о.	Кількість хворих, n/%	Рівень мРНК NANOG, у.о.
Рівень ПСА				
<10 нг/мл	18 / 31,0	$1,52 \pm 0,18$	25 / 40,3	$6,11 \pm 0,54$
>10 нг/мл	40 / 68,9	$2,97 \pm 0,12^*$	37 / 59,7	$11,07 \pm 1,72^*$
Категорія Т				
T2	41 / 70,7	$1,60 \pm 0,23$	32 / 51,6	$7,05 \pm 1,21$
T3	14 / 24,1	$2,74 \pm 0,19^*$	22 / 35,4	$10,44 \pm 1,74^*$
T4	3 / 5,2	$2,48 \pm 0,20$	8 / 12,9	$9,11 \pm 1,18^*$
Категорія N				
Відсутні	53 / 91,4	$1,86 \pm 0,26$	52 / 83,9	$5,36 \pm 0,39$
Наявні	5 / 8,6	$2,57 \pm 0,19^*$	10 / 16,1	$11,57 \pm 1,38^*$
Градація за Глісоном				
<7 балів	17 / 29,3	$2,22 \pm 0,34$	18 / 29,0	$6,22 \pm 0,60$
≥ 7 балів	41 / 70,7	$2,07 \pm 0,30$	44 / 71,0	$13,39 \pm 1,20^*$

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

Продemonстровано, що у пацієнтів з новоутвореннями локалізованими в ПЗ рівень мРНК NANOG в пухлинній тканині був у 1,71 та 1,81 рази нижчим у порівнянні з хворими з пухлинами, які виходили за межі капсули органу, як в 1 та 2 досліджуваних групах.

Відомо, що саме розвиток метастазів є однією з основних причин смертності від раку [194]. Нами визначено, що рівень мРНК NANOG в пухлинній тканині хворих на РПЗ 1 та 2 групи з наявністю метастатичного ураженням РЛВ був у 1,38 та 2,5 рази вищим і становив $2,57 \pm 0,19$ у.о. та $11,57 \pm 1,38$ у.о., відповідно, порівняно з пацієнтами без метастазів ($1,86 \pm 0,26$ у.о. та $5,36 \pm 0,39$ у.о., відповідно) (Табл.5.1.1). Аналіз рівня мРНК NANOG в пухлинній тканині хворих на РПЗ 1-ї групи не виявив залежності цього показника від ступеня диференціювання РПЗ. В протилежність цьому, у пацієнтів з 2 досліджуваної групи встановлено, що підвищення експресії мРНК NANOG в 2,15 рази асоціюється зі зростанням суми балів за Глісоном (Табл.5.1.1).

Визначена в нашому дослідженні гетерогенність експресії мРНК NANOG у пухлинній тканині хворих на РПЗ стала підґрунтям для проведення кореляційного аналізу за Спірменом, результати якого подані в Табл. 5.1.2.

Таблиця 5.1.2

Кореляція рівня мРНК NANOG з основними клініко-патологічними параметрами РПЗ

Пари кореляцій		Група хворих № 1		Група хворих № 2	
		ρ	ρ	ρ	ρ
Рівень мРНК NANOG	Категорія Т	0,42	<0,05	0,72	<0,05
	Категорія N	0,70	<0,05	0,75	<0,05
	Сума балів за Глісоном	-0,12	>0,05	0,54	<0,05
	Рівень ПСА	0,58	<0,05	0,64	<0,05

Встановлено, що рівень мРНК NANOG в обох досліджуваних групах прямо корелював із доопераційним рівнем ПСА в сироватці крові хворих, стадією захворювання та наявністю метастазів в РЛВ. З наведеної таблиці

видно, що нами не виявлено існування кореляційного зв'язку між рівнем мРНК NANOG в пухлинних клітинах та сумою балів за Глісоном для групи хворих із рівнем мРНК NANOG меншим 4 у.о. Натомість, встановлено позитивний кореляційний зв'язок між цими показниками для пацієнтів 2 групи, зі значеннями мРНК NANOG більшими за 4 у.о. Отже, нами продемонстровано, що підвищена експресія мРНК NANOG в пухлинній тканині асоційована з такими показниками злоякісності РПЗ як високий доопераційний рівень ПСА в сироватці крові хворих, наявність метастатичного ураження РЛВ та висока сума балів за Глісоном.

Отже, отримані дані демонструють поліфункціональність ПСК та мРНК NANOG їх зв'язок з показниками агресивності пухлинного процесу у хворих на РПЗ. З огляду на отримані результати нами було проведено аналіз показників безрецидивної виживаності хворих на РПЗ залежно від наявності маркерів ПСК та рівня мРНК NANOG (Рис. 5.1.4).

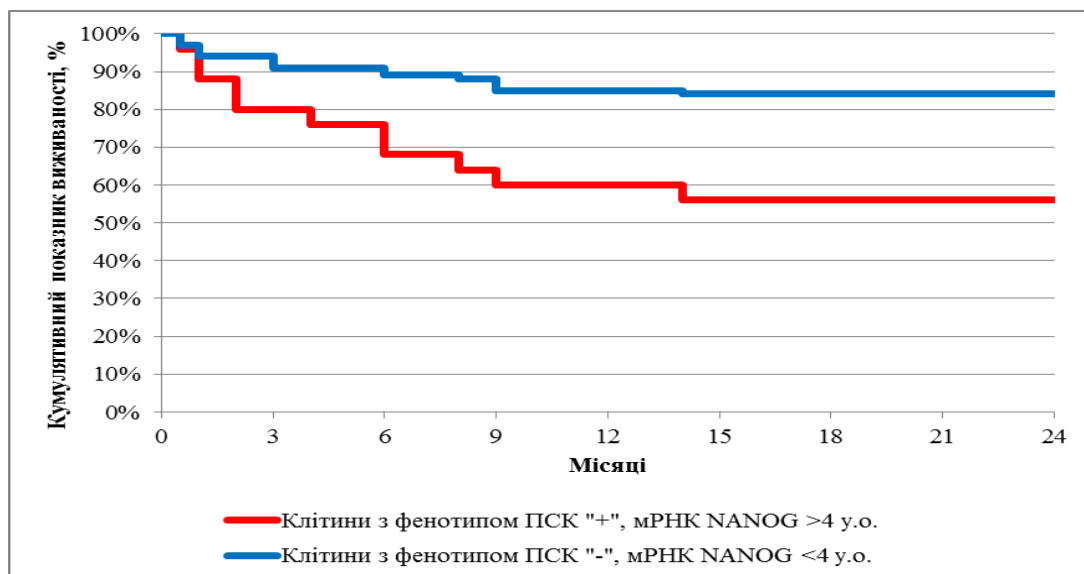


Рис. 5.1.4. Безрецидивна виживаність хворих залежно від наявності а клітин з фенотипом ПСК та рівня мРНК NANOG у тканині РПЗ за методом Каплана–Мейєра (log-ranktest)

Як видно з наведених даних, достовірне зниження показників дворічної безрецидивної виживаності на 27 % встановлено у хворих з наявністю клітин з фенотипом ПСК у тканині РПЗ та рівнем мРНК NANOG >4 у.о.

5.2. Зв'язок рівня мРНК NANOG та маркерів ПСК з особливостями молекулярного профілю новоутворень РПЗ

З огляду на значну варіабельність клінічного перебігу РПЗ, що обумовлена його біологічними особливостями, наступним етапом дослідження стало вивчення залежності експресії мРНК NANOG в клітинах РПЗ від особливостей молекулярного профілю новоутворень.

Продемонстровано, що високий рівень мРНК NANOG є характерною ознакою у AR-позитивних пухлин в обох досліджених групах хворих на РПЗ (Рис.5.2.1). Так у 1 та 2 групах хворих рівень мРНК NANOG у AR-негативних пухлинних клітинах становив $1,93 \pm 0,19$ у.о. та $6,88 \pm 1,69$ у.о., відповідно, що в 1,22 та 1,57 рази менше ніж в AR-позитивних новоутвореннях (Табл. 5.2.1).

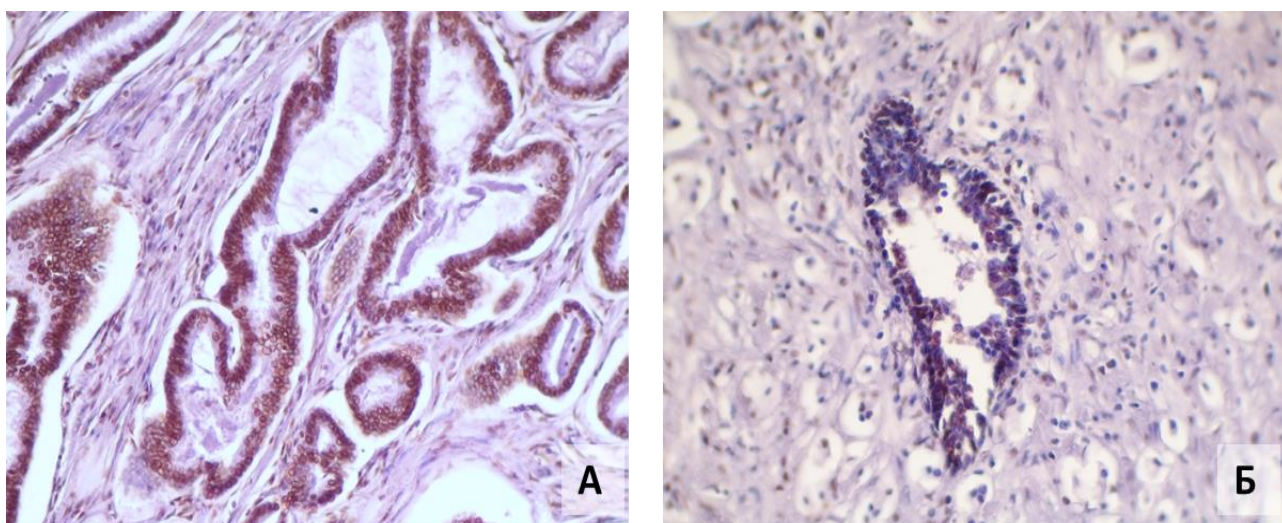


Рис. 5.2.1. Наявність (А) та відсутність (Б) експресії AR в пухлинній тканині хворих на РПЗ. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Меєра. Зб. $\times 200$.

Високий рівень експресії Ki-67 визначався у 2,5 рази частіше у новоутвореннях пацієнтів з рівнем мРНК NANOG більше 4 у.о. (Рис.5.2.2). При цьому встановлено, що високий рівень експресії Ki-67 в пухлинних клітинах асоціюється зі збільшенням рівня мРНК NANOG у в 1,35 та 2,22 рази у хворих 1 та 2 досліджуваних груп, відповідно.

Таблиця 5.2.1

Зв'язок експресії мРНК NANOG у пухлинній тканині хворих на РПЗ з особливостями молекулярного профілю новоутворень

Показник	Група хворих № 1 (Рівень мРНК NANOG < 4у.о.)	Група хворих № 2 (Рівень мРНК NANOG > 4у.о.)
	Рівень мРНК NANOG, у.о.	Рівень мРНК NANOG, у.о.
Експресія AR		
Відсутня	1,93±0,19	6,88±1,69
Наявна	2,36±0,16*	10,84±1,38*
Рівень експресії Ki-67		
Низький	1,78±0,16	5,21±1,38
Високий	2,41±0,32*	11,57±0,34*
Експресія маркерів ПСК		
Відсутні	1,85±0,11	5,98±0,56
Наявні	2,39±0,28*	13,39±1,20*

Примітка: * $p < 0,05$ порівняно з пацієнтами із рівнем мРНК меншим за 4 у.о.

Враховуючи роль NANOG в процесах самооновлення та підтримання плюрипотентності клітин, ми вважали за потрібним проаналізувати залежність його рівня від наявності маркерів ПСК в пухлинній тканині РПЗ. В нашому дослідженні відсутність експресії маркерів ПСК спостерігалась в більшості новоутворень 1 групи хворих, в той час як у більшості досліджених випадків РПЗ хворих 2 групи ідентифіковано клітини з фенотипом $CD44^{+}CD24^{-low}$. Встановлено, що високі показники мРНК NANOG в пухлинних клітинах хворих обох досліджуваних груп ($2,39 \pm 0,28$ у.о. та $13,39 \pm 1,20$ у.о.) асоціювались з наявністю експресії маркерів ПСК в новоутвореннях РПЗ.

Результати проведеного кореляційного аналізу за Спірменом наведені в Табл. 5.2.2. Показано, що в обох досліджених групах хворих на РПЗ рівень

мРНК NANOG корелює з високою експресією AR та Ki-67, а також з наявністю маркерів ПСК у пухлинних клітинах хворих на РПЗ 2 групи.

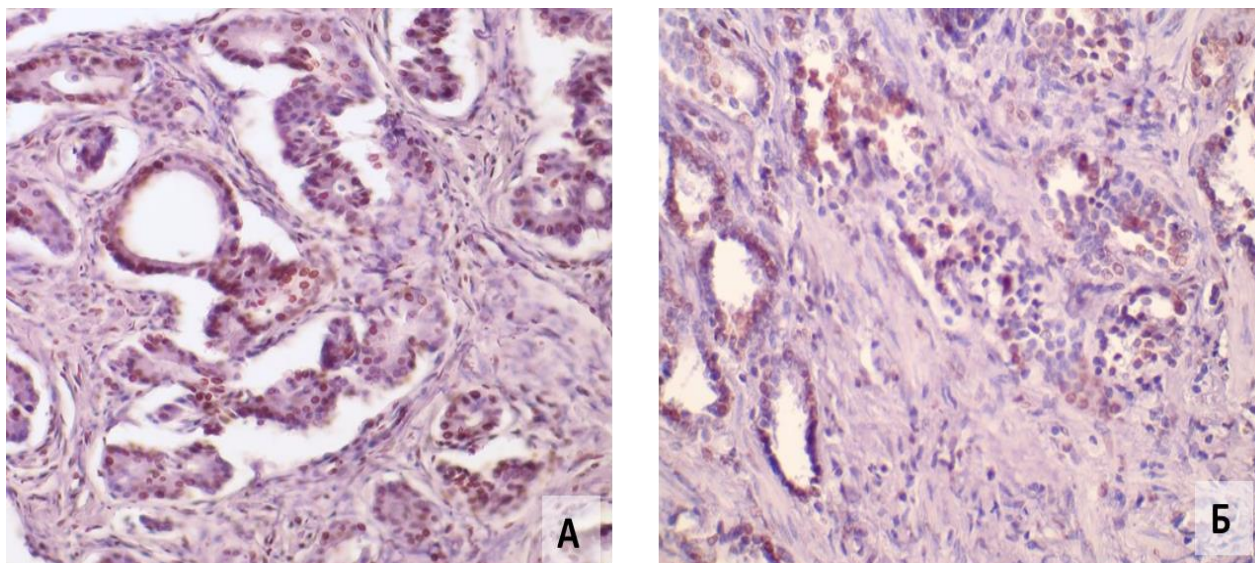


Рис. 5.2.2. Експресія Ki-67 у клітинах РПЗ: А- високий рівень експресії; Б - низький рівень експресії. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Меєра. Зб. $\times 200$.

Таблиця 5.2.2

Кореляція рівня мРНК NANOG у пухлинних клітинах з особливостями молекулярного профілю

Пари кореляцій		Група хворих № 1		Група хворих № 2	
		ρ	ρ	P	p
Рівень мРНК NANOG	Експресія AR	0,44	$<0,05$	0,52	$<0,05$
	Експресія Ki-67	0,52	$<0,05$	0,60	$<0,05$
	Кількість ПСК- позитвних пухлин	0,13	$>0,05$	0,75	$<0,05$

Таким чином, згідно отриманих даних, високі показники мРНК NANOG в пухлинних клітинах асоціюються з такими показниками злоякісності РПЗ як експресія AR, висока проліферативна активність та наявність маркерів ПСК ($p < 0,05$).

Наступним етапом нашої роботи стало дослідження особливостей експресії маркерів проліферації (Ki-67) та клітинної адгезії (Е- та N-кадгерин) у хворих на РПЗ залежно від наявності маркерів ПСК в тканині злоякісних новоутворень. Згідно з результатами представленими на Рис. 5.2.3. в обох досліджуваних групах, переважали новоутворення з високою проліферативною активністю. Так рівень експресії Ki-67 ≥ 100 балів H-Score був виявлений у 73,6% та в 61,2% випадків РПЗ з наявністю та відсутністю клітин з фенотипом ПСК, відповідно (Рис.5.2.3).

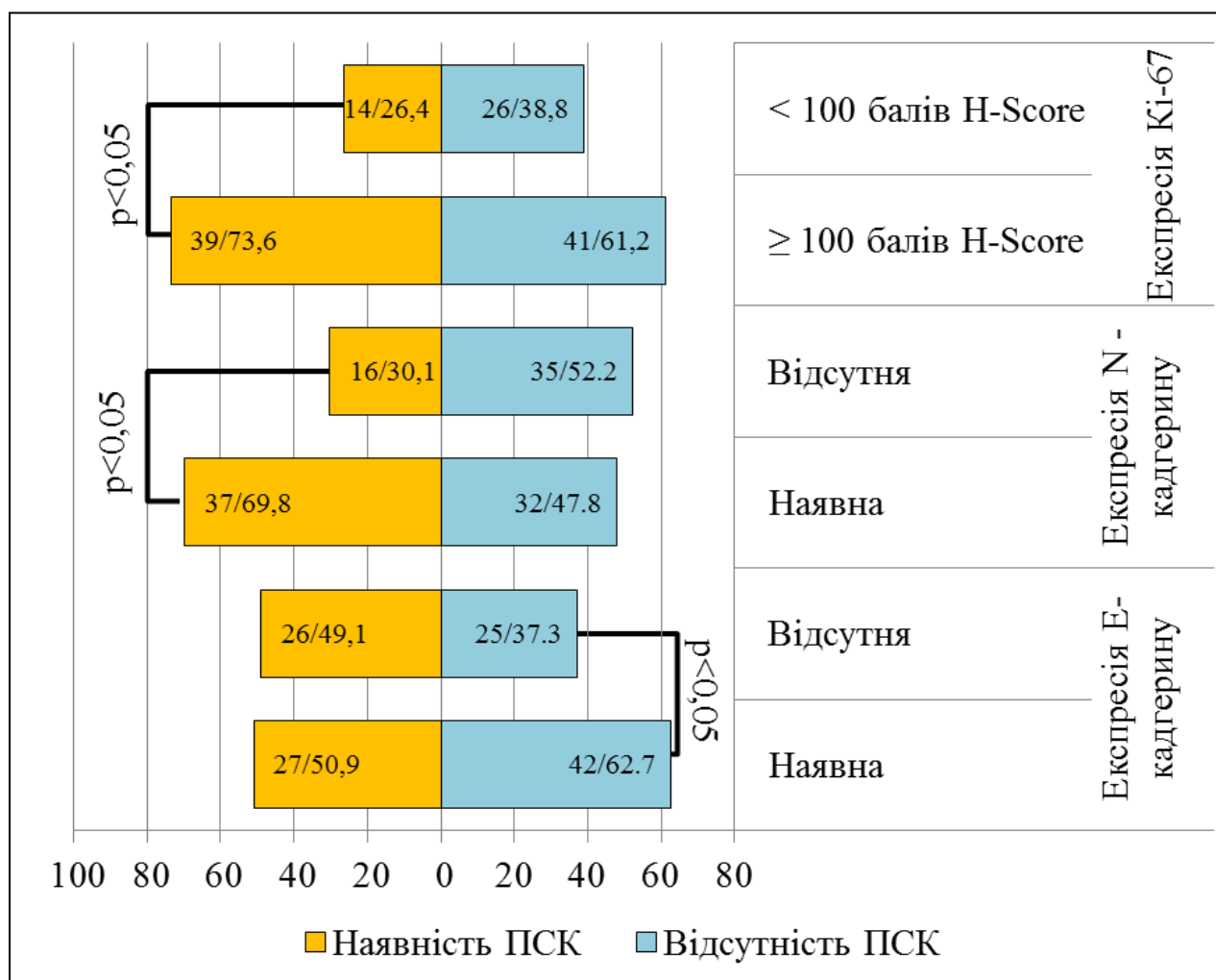


Рис. 5.2.3. Зв'язок наявності клітин з фенотипом ПСК з експресією маркерів проліферації та міжклітинної адгезії у клітинах РПЗ.

Виявлено певні особливості експресії адгезивних молекул залежно від наявності ПСК (Рис.5.2.3). Так у пухлинах хворих на РПЗ з фенотипом ПСК майже в половині випадків була відсутня експресія E-кадгерину (49,1%) та

частіше відмічали наявність N-кадгерину (69,8 % випадків). У той час як тканина новоутворень з відсутністю маркерів ПСК частіше характеризувалась експресією E-кадгерину (62,7%) та відсутністю N-кадгерину (52,2%) (Рис. 5.2.4).

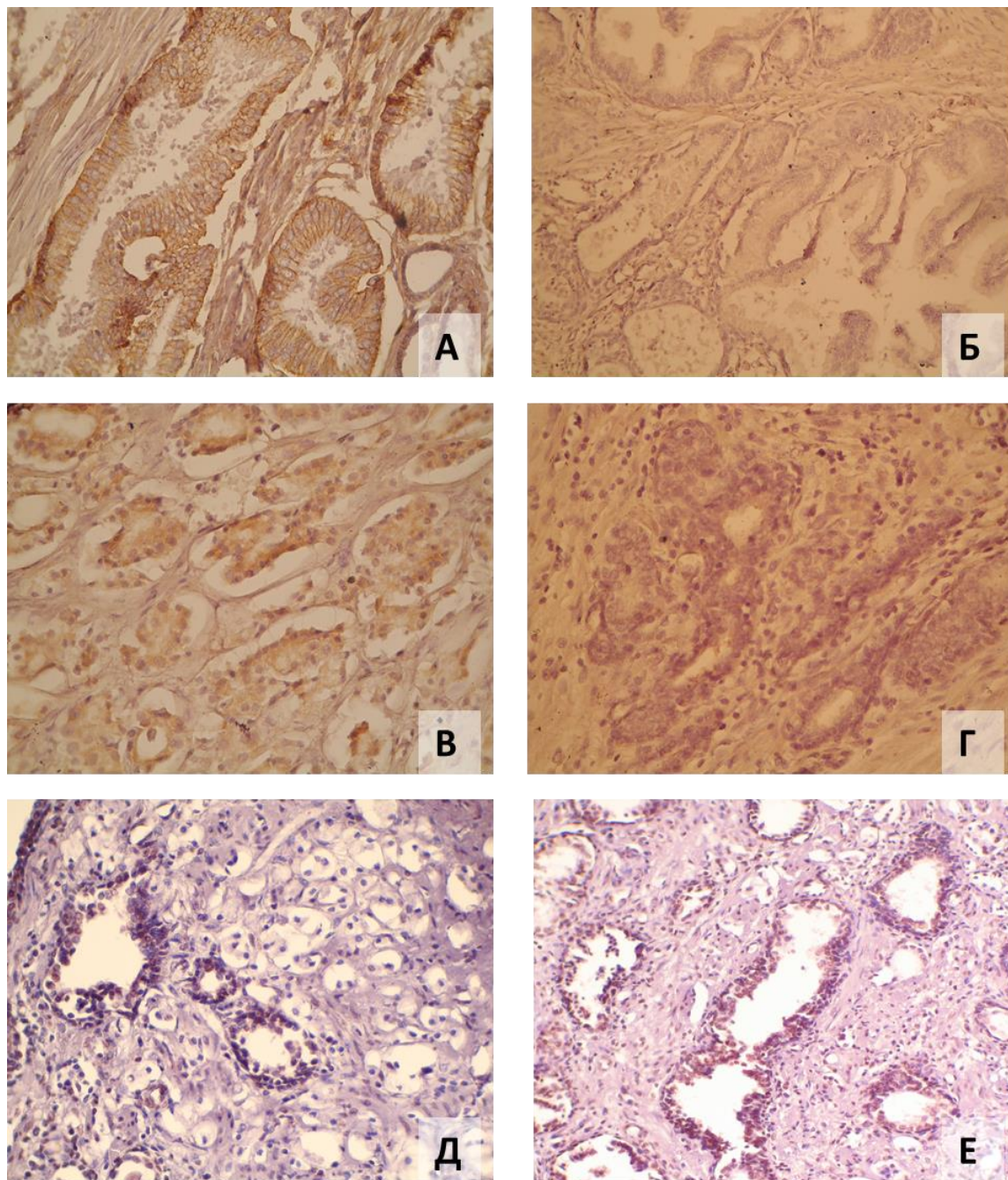


Рис. 5.2.5. Особливості експресії маркерів проліферації та міжклітинної адгезії у клітинах РПЗ: А – наявність і Б – відсутність експресії E-кадгерину, В – наявність і Г – відсутність експресії N-кадгерину, експресія Ki-67 (Д – < 100 балів H-Score, Е – $\geq$ 100 балів H-Score) в пухлинних клітинах РПЗ. Імуногістохімія. Дофарбовування гематоксиліном Мейєра. Зб. $\times 200$.

Проведений нами детальний аналіз експресії Ki-67 у пацієнтів з РПЗ залежно від наявності клітин з фенотипом ПСК та клініко-патологічних характеристик встановив ряд закономірностей (Табл. 5.2.3).

Таблиця 5.2.3

Проліферативна активність РПЗ залежно від наявності клітин з фенотипом ПСК та клініко-патологічних характеристик пацієнтів

Показник		Наявність ПСК		Відсутність ПСК	
		Експресія Ki-67			
		< 100 балів H-Score	≥ 100 балів H-Score	< 100 балів H-Score	≥ 100 балів H-Score
Стадія	II	9 / 37,5	15 / 62,5	16 / 34,8	30 / 65,2
	III	3 / 16,7	15 / 83,3 ^{II}	7 / 50,0 ^{II}	7 / 50,0
	IV	2 / 18,2	9 / 81,8 ^{II}	3 / 42,9	4 / 57,1
Категорія T	T2	8 / 30,8	18 / 69,2	16 / 34,0	31 / 66,0
	T3	4 / 21,0	15 / 79,0	8 / 47,1	9 / 52,9
	T4	2 / 25,0	6 / 75,0	2 / 66,7	1 / 33,3
Категорія N	N0	14 / 32,6	29 / 67,4	24 / 38,7	38 / 61,3
	N1	-	10 / 100,0*	2 / 40,0	3 / 60,0
Сума балів за Глісоном	<7	2 / 33,3	4 / 66,7	17 / 58,6	12 / 41,4
	≥7	12 / 25,5	35 / 74,5	9 / 23,7*	29 / 76,3*
Рівень ПСА, нг/мл	<10	8 / 80,0	2 / 20,0	18 / 54,5	15 / 45,5
	>10	4 / 9,3	39 / 90,7*	8 / 23,5*	26 / 76,4*

Примітки: ^{II} – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із II стадією РПЗ у межах відповідної групи ($p < 0,05$); ^{III} – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із III стадією РПЗ у межах відповідної групи ($p < 0,05$); * – $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РПЗ в межах досліджуваної групи

Виявлено, що висока проліферативна активність пухлин була характерна для злоякісних новоутворень з наявністю експресії маркерів ПСК: високий рівень експресії Ki-67 зафіксовано в 62,5% новоутворень пацієнтів з II стадією захворювання, що достовірно нижче порівняно з аналогічними показниками пацієнтів на III чи IV стадії пухлинного процесу – 83,3% та 81,8%, відповідно.

Показано, що у групі хворих на РПЗ у новоутвореннях яких відмічали наявність ПСК та високим рівнем проліферативної активності достовірно частіше спостерігали наявність метастазів в РЛВ (100% випадків) та підвищення рівня ПСА більш 10 нг/мл (у 90,7%). У цієї ж групи хворих на рівні тенденції виявлено зростання випадків з категорією T₃ та низьким ступенем диференціювання пухлини (Табл. 5.2.3). У пацієнтів з РПЗ з відсутністю експресії маркерів ПСК та з рівнем Ki-67 більшим 100 балів H-Score достовірно частіше спостерігали високі доопераційні рівні ПСК (≥ 10 нг/мл) та низький ступінь диференціювання пухлини.

Як видно з представлених даних у Табл. 5.2.4., у хворих на РПЗ з новоутвореннями, позитивними за маркерами ПСК та відсутністю експресії E-кадгерину достовірно частіше спостерігали пізню клінічну стадію захворювання, більшу категорію T, наявність метастазів в РЛВ та високий рівень доопераційного ПСА. Також у таких хворих на рівні тенденції відмічали збільшення відносної кількості пухлини низького ступеня диференціювання.

Що стосується експресії N-кадгерину, то її наявність визначали у більшості випадків РПЗ при наявності експресії маркерів ПСК (Табл. 5.2.5). Достовірно більша кількість новоутворень з високою експресією цієї молекули адгезії була характерна для пухлин з низьким ступенем диференціювання та у хворих з високим доопераційним рівнем ПСА.

Таблиця 5.2.4

Експресія Е-кадгерину у клітинах РПЗ залежно від наявності клітин з фенотипом ПСК та клініко-патологічних характеристик пацієнтів

Показник		Наявність ПСК		Відсутність ПСК	
		Експресія Е-кадгерину			
		Відсутня	Наявна	Відсутня	Наявна
Стадія	II	9 / 37,5	15 / 62,5	15 / 32,6	31 / 67,4
	III	10 / 55,6 ^{II}	8 / 44,4 ^{II}	7 / 50,0 ^{II}	7 / 50,0 ^{II}
	IV	7 / 63,6 ^{II, III}	4 / 36,4 ^{II}	3 / 42,9	4 / 57,1
Категорія T	T2	8 / 30,8	18 / 69,2	18 / 38,3	29 / 61,7
	T3	10 / 52,6 ²	9 / 47,4 ²	5 / 29,4	12 / 70,6
	T4	6 / 75,0 ^{2, 3}	2 / 25,0	2 / 66,7	1 / 33,3
Категорія N	N0	19 / 44,2	24 / 55,8	24 / 38, 7	38 / 61,3
	N1	7 / 70,0*	3 / 30,0	1 / 20,0	4 / 80,0*
Сума балів за Глісоном	<7	2 / 33,3	4 / 66,7	13 / 44,8	16 / 55,2
	≥7	23 / 48,9	24 / 51,1	12 / 31,6*	26 / 68,4*
Рівень ПСА, нг/мл	<10	7 / 70	3 / 30	12 / 36,4	21 / 63,4
	>10	22 / 51,2*	21 / 48,8	13 / 38,2	21 / 61,8

Примітки: ^{II} – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із II стадією РПЗ у межах відповідної групи ($p < 0,05$); ^{III} – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із III стадією РПЗ у межах відповідної групи ($p < 0,05$); ² – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із категорією T2 у межах відповідної групи ($p < 0,05$); ³ – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із T3 категорією у межах відповідної групи; * – $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РПЗ в межах досліджуваної групи

Таблиця 5.2.5

Експресія N-кадгерину у клітинах РПЗ залежно від наявності клітин з фенотипом ПСК та клініко-патологічних характеристик

Показник		Наявність ПСК		Відсутність ПСК	
		Експресія N-кадгерину			
		Відсутня	Наявна	Відсутня	Наявна
Стадія	II	8 / 33,3	16 / 66,7	24 / 52,2	22 / 47,8
	III	5 / 27,8	13 / 72,2	8 / 57,1	6 / 42,9
	IV	3 / 27,3	8 / 72,7	3 / 42,9	4 / 57,1
Категорія T	T2	8 / 30,8	18 / 69,2	22 / 46,8	25 / 53,2
	T3	7 / 36,8	12 / 63,2	10 / 58,8 ²	7 / 41,2
	T4	1 / 12,5	7 / 87,5 ^{2, 3}	3 / 100,0	-
Категорія N	N0	14 / 35,6	29 / 67,4	33 / 53,2	29 / 46,2
	N1	3 / 30,0	7 / 70,0	2 / 40,0	3 / 60,0
Сума балів за Глісоном	<7	3 / 50,0	3 / 50,0	15 / 51,7	14 / 48,3
	≥7	13 / 27,7	34 / 72,3*	20 / 52,6	18 / 47,4
Рівень ПСА, нг/мл	<10	5 / 50,0	5 / 50,0	15 / 45,5	18 / 54,5
	>10	11 / 25,6	32 / 74,4*	20 / 58,8*	14 / 41,2*

Примітки: ² – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із T2 категорією у межах відповідної групи ($p < 0,05$); ³ – різниця достовірна порівняно з показниками хворих із T3 категорією у межах відповідної групи; * – $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РПЗ в межах досліджуваної групи

Результати дослідження маркерів ПСК та мРНК NANOG з особливостями молекулярного профілю новоутворень стали підґрунтям для дослідження їх можливих протеїн-протеїнових взаємодій (protein-protein interaction) за

допомогою бази даних та алгоритму STRING v.11.0. Отримані результати карти взаємодії, що відображає відомі і прогнозовані білкові взаємодії (включаючи як прямі (фізичні), так і непрямі (функціональні) асоціації) представлені на Рис. 5.2.6. Продемонстровано, що між 7 досліджуваними протеїнами (вузлами на карті) встановлено 20 можливих взаємодій (лінії/ребра між вузлами).

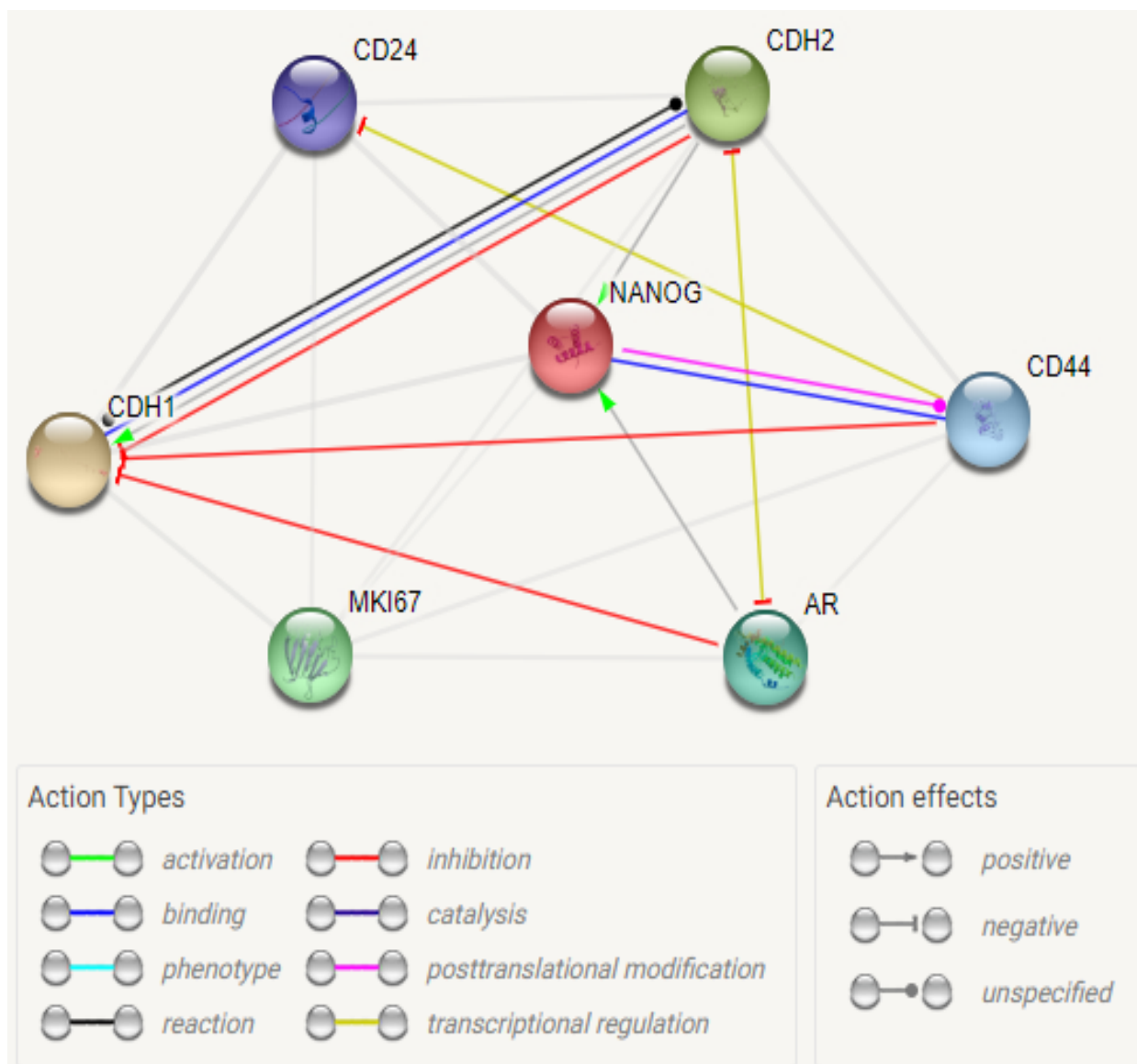


Рис. 5.2.6. Карта взаємодії білків, зміна експресії яких була зафіксована нами залежно від наявності ПСК та рівня мРНК NANOGу тканині РПЗ.

Примітки: CDH1—Е-кадгерин, CDH2—N-кадгерин, MKI67 — Ki-67

Ці результати дозволяють пояснити встановлені нами асоціативні зв'язки між маркерами ПСК, рівнем мРНК NANOG та молекулярними характеристиками

РПЗ. Зокрема встановлено, що AR можуть активувати NANOG, який в свою чергу здатний зв'язується з іншим маркером ПСК – CD44 (коефіцієнт взаємодії 0,967 (Табл. 5.2.6). Також виявлено, що AR, CD44 та N-кадгерин здатні інгібувати експресію E-кадгерину, що пояснює високу метастатичну активність пухлин з фенотипом ПСК. Крім того встановлено взаємне інгібування на транскрипційному рівні між N-кадгерином та AR (коефіцієнт взаємодії становив 0,650).

Таблиця 5.2.6

Коефіцієнти взаємодії між досліджуваними протеїнами отримані в ході аналізу з використанням платформи STRING version 11.0.

Browse interactions in tabular form:

node1	node2	node1 accession	node2 accession	node1 annotation	node2 annotation	score
AR	CD44	ENSP00000363822	ENSP00000398632	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	0.510
AR	CDH1	ENSP00000363822	ENSP00000261769	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	0.781
AR	CDH2	ENSP00000363822	ENSP00000269141	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	0.685
AR	MKI67	ENSP00000363822	ENSP00000357643	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	0.530
AR	NANOG	ENSP00000363822	ENSP00000229307	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	Homeobox protein NANOG; Transcription ...	0.650
CD24	CD44	ENSP00000483985	ENSP00000398632	Signal transducer CD24; May have a pivot...	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	0.934
CD24	CDH1	ENSP00000483985	ENSP00000261769	Signal transducer CD24; May have a pivot...	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	0.728
CD24	CDH2	ENSP00000483985	ENSP00000269141	Signal transducer CD24; May have a pivot...	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	0.567
CD24	MKI67	ENSP00000483985	ENSP00000357643	Signal transducer CD24; May have a pivot...	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	0.512
CD24	NANOG	ENSP00000483985	ENSP00000229307	Signal transducer CD24; May have a pivot...	Homeobox protein NANOG; Transcription ...	0.677
CD44	AR	ENSP00000398632	ENSP00000363822	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	0.510
CD44	CD24	ENSP00000398632	ENSP00000483985	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	Signal transducer CD24; May have a pivot...	0.934
CD44	CDH1	ENSP00000398632	ENSP00000261769	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	0.838
CD44	CDH2	ENSP00000398632	ENSP00000269141	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	0.673
CD44	MKI67	ENSP00000398632	ENSP00000357643	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	0.555
CD44	NANOG	ENSP00000398632	ENSP00000229307	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	Homeobox protein NANOG; Transcription ...	0.967
CDH1	AR	ENSP00000261769	ENSP00000363822	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	0.781
CDH1	CD24	ENSP00000261769	ENSP00000483985	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	Signal transducer CD24; May have a pivot...	0.728
CDH1	CD44	ENSP00000261769	ENSP00000398632	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	0.838
CDH1	CDH2	ENSP00000261769	ENSP00000269141	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	0.907
CDH1	MKI67	ENSP00000261769	ENSP00000357643	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	0.614
CDH1	NANOG	ENSP00000261769	ENSP00000229307	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	Homeobox protein NANOG; Transcription ...	0.692
CDH2	AR	ENSP00000269141	ENSP00000363822	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	0.685
CDH2	CD24	ENSP00000269141	ENSP00000483985	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	Signal transducer CD24; May have a pivot...	0.567
CDH2	CD44	ENSP00000269141	ENSP00000398632	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	0.673
CDH2	CDH1	ENSP00000269141	ENSP00000261769	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	0.907
CDH2	MKI67	ENSP00000269141	ENSP00000357643	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	0.489
CDH2	NANOG	ENSP00000269141	ENSP00000229307	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	Homeobox protein NANOG; Transcription ...	0.786
MKI67	AR	ENSP00000357643	ENSP00000363822	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	0.530
MKI67	CD24	ENSP00000357643	ENSP00000483985	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	Signal transducer CD24; May have a pivot...	0.512
MKI67	CD44	ENSP00000357643	ENSP00000398632	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	0.555
MKI67	CDH1	ENSP00000357643	ENSP00000261769	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	0.614
MKI67	CDH2	ENSP00000357643	ENSP00000269141	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	0.489
MKI67	NANOG	ENSP00000357643	ENSP00000229307	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	Homeobox protein NANOG; Transcription ...	0.415
NANOG	AR	ENSP00000229307	ENSP00000363822	Homeobox protein NANOG; Transcription...	Androgen receptor; Steroid hormone rece...	0.650
NANOG	CD24	ENSP00000229307	ENSP00000483985	Homeobox protein NANOG; Transcription...	Signal transducer CD24; May have a pivot...	0.677
NANOG	CD44	ENSP00000229307	ENSP00000398632	Homeobox protein NANOG; Transcription...	CD44 antigen; Receptor for hyaluronic aci...	0.967
NANOG	CDH1	ENSP00000229307	ENSP00000261769	Homeobox protein NANOG; Transcription...	Cadherin-1; Cadherins are calcium-depen...	0.692
NANOG	CDH2	ENSP00000229307	ENSP00000269141	Homeobox protein NANOG; Transcription...	Cadherin-2; Cadherins are calcium-depen...	0.786
NANOG	MKI67	ENSP00000229307	ENSP00000357643	Homeobox protein NANOG; Transcription...	Proliferation marker protein Ki-67; Requir...	0.415

Таким чином наше дослідження продемонструвало що наявність ПСК в пухлинній тканині хворих на РПЗ асоціюється із високою проліферативною активністю пухлинних клітин та порушенням їх адгезивних властивостей за рахунок зниження експресії Е-кадгерину та підвищення рівня N-кадгерину.

Підсумки. 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 і органи (72,7 % випадків).

Середній рівень експресії мРНК NANOG у пухлинних клітинах хворих загальної групи становив $4,18 \pm 0,65$ у.о. При аналізі зв'язку рівнів експресії мРНК NANOG з основними клініко-патологічними характеристиками пацієнтів, найвищі показники експресії зазначеного маркера зафіксовано у хворих, пухлини яких виходили за межі капсули органу ($10,4 \pm 1,7$ у.о., $p=0,72$), за наявності метастатичного ураженням 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., $p=0,64$).

Виявлено, що висока експресія мРНК NANOG асоціюється з такими молекулярно-біологічними особливостями РПЗ як експресія AR ($p=0,52$), Ki-67 ($p=0,63$), наявність ПСК ($p=0,75$).

Показано, що наявність ПСК в пухлинній тканині хворих на РПЗ асоціюється із високою проліферативною активністю пухлинних клітин та порушенням їх адгезивних властивостей за рахунок зниження експресії Е-кадгерину та підвищення рівня N-кадгерину.

Таким чином, наявність клітин із фенотипом ПСК та рівень мРНК NANOGу пухлинній тканині асоціюється з несприятливим перебігом РПЗ, який за клініко-патологічними показниками відрізняється високим ступенем злоякісності.

Результати досліджень, викладені у Розділі 5, опубліковані у наступних роботах: 197-203

РОЗДІЛ 6.

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ПУХЛИННИХ ТА ЦИРКУЛЮЮЧИХ мікроРНК-205 ТА -214, АСОЦІЙОВАНИХ ЗІ СТУПЕНЕМ ЗЛОЯКІСНОСТІ РПЗ

Дослідження останніх років призвели до ідентифікації цілого ряду мікроРНК, які експресуються в пухлинах різного генезу, в тому числі і РПЗ [17-20, 157]. Сьогодні не викликає сумнівів те, що виникнення та прогресування новоутворень може бути наслідком зниженням рівня мікроРНК, які інгібують пухлину та/або гіперекспресією онкогенних мікроРНК, проте відомості про їх специфічність та роль в прогресії пухлинного захворювання є достатньо суперечливими [18-20, 81]. Саме тому вивчення можливості використання їх в ролі діагностичних та прогностичних маркерів є особливо актуальним.

На підставі результатів дослідження отриманих в системі *in vitro* (Розділ 3.3) та 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.

В основу цього фрагменту роботи лягли результати обстеження та лікування матеріалі 113 хворих на РПЗ II-IV стадії проспективної групи, що перебували на лікуванні в Національному інституті раку МОЗ України протягом 2015–2017 рр.. Детальна клініко-патологічна характеристика цієї групи хворих подана в розділі 2.3.1.

Аналіз отриманих результатів дослідження експресії мікроРНК в сироватці крові хворих на злоякісні новоутворення ПЗ продемонстрував, що досліджувані зразки характеризуються високим рівнем мікроРНК-205 і мікроРНК-214 (Табл. 6.1.1) у порівнянні з показниками умовно здорових донорів. Зокрема, показники мікроРНК-205 у сироватці крові хворих на РПЗ достовірно перевищували такі у умовно здорових донорів ($0,16 \pm 0,08$ у.о.). Рівень

циркулюючої мікроРНК-214 у хворих на РПЗ становив $1,15 \pm 0,21$ у.о. і був значно підвищений у порівнянні з умовно здоровими індивідами (у 6,1 рази).

Таблиця 6.1.1

Рівень експресії мікроРНК в сироватці крові умовно здорових донорів та хворих на злоякісні новоутворення ПЗ

	Відносний рівень експресії мікроРНК у.о.	
	Норма	РПЗ
МікроРНК-205	$0,16 \pm 0,08$	$2,98 \pm 0,37^*$
МікроРНК-214	$0,19 \pm 0,15$	$1,15 \pm 0,21^*$

Примітка.* $p < 0,05$ порівняно із сироваткою крові здорових донорів.

Виявлено, що рівні експресії мікроРНК-205 та мікроРНК-214 прямо корелюють зі стадією пухлинного процесу ($\rho=0,63$; $p<0,05$ та $\rho=0,55$; $p<0,05$) відповідно. Зокрема, рівень мікроРНК-205 у хворих з II стадією РПЗ становив $2,36 \pm 0,30$ у.о., а мікроРНК-214 - $0,75 \pm 0,20$ у.о., що у 1,3 та 1,6 разів, відповідно, нижче порівняно з пацієнтами із III стадією та в 1,5 та 2,0 рази у порівнянні з групою хворих із IV стадією пухлинного процесу (Рис. 6.1.1).

Встановлено існування залежності між відносним рівнем експресії циркулюючих мікроРНК та категорією Т за TNM у хворих на РПЗ. Зокрема, рівні мікроРНК-205 та мікроРНК-214 у пацієнтів з T2 категорією РПЗ ($2,21 \pm 0,30$ у.о. та $0,82 \pm 0,16$ у.о.) були в 1,6 та 2,0 разів більшими, порівняно з аналогічними показниками хворих з T3-пухлинами ($3,34 \pm 0,37$ у.о. та $1,26 \pm 0,19$ у.о., відповідно) (Рис. 6.1.1(Б)). Достовірної різниці у показниках досліджуваних мікроРНК з пухлинами категорії T4 не виявлено, що можна пояснити невеликим розміром цієї групи хворих.

Заслуговує на увагу і той факт, що показники досліджуваних циркулюючих мікроРНК асоціювались з наявністю метастазів в РЛВ у хворих на РПЗ. Згідно результатів представлених, на Рис. 6.1.2 та Рис. 6.1.3 рівні мікроРНК-205 та мікроРНК-214 були підвищеними в 1,3 та 2,0 рази, відповідно, у сироватці

крові хворих з наявністю регіонарних метастазів. Коефіцієнти кореляції становили $\rho = -0,50$; $p < 0,05$ та $\rho = -0,63$; $p < 0,05$ відповідно.

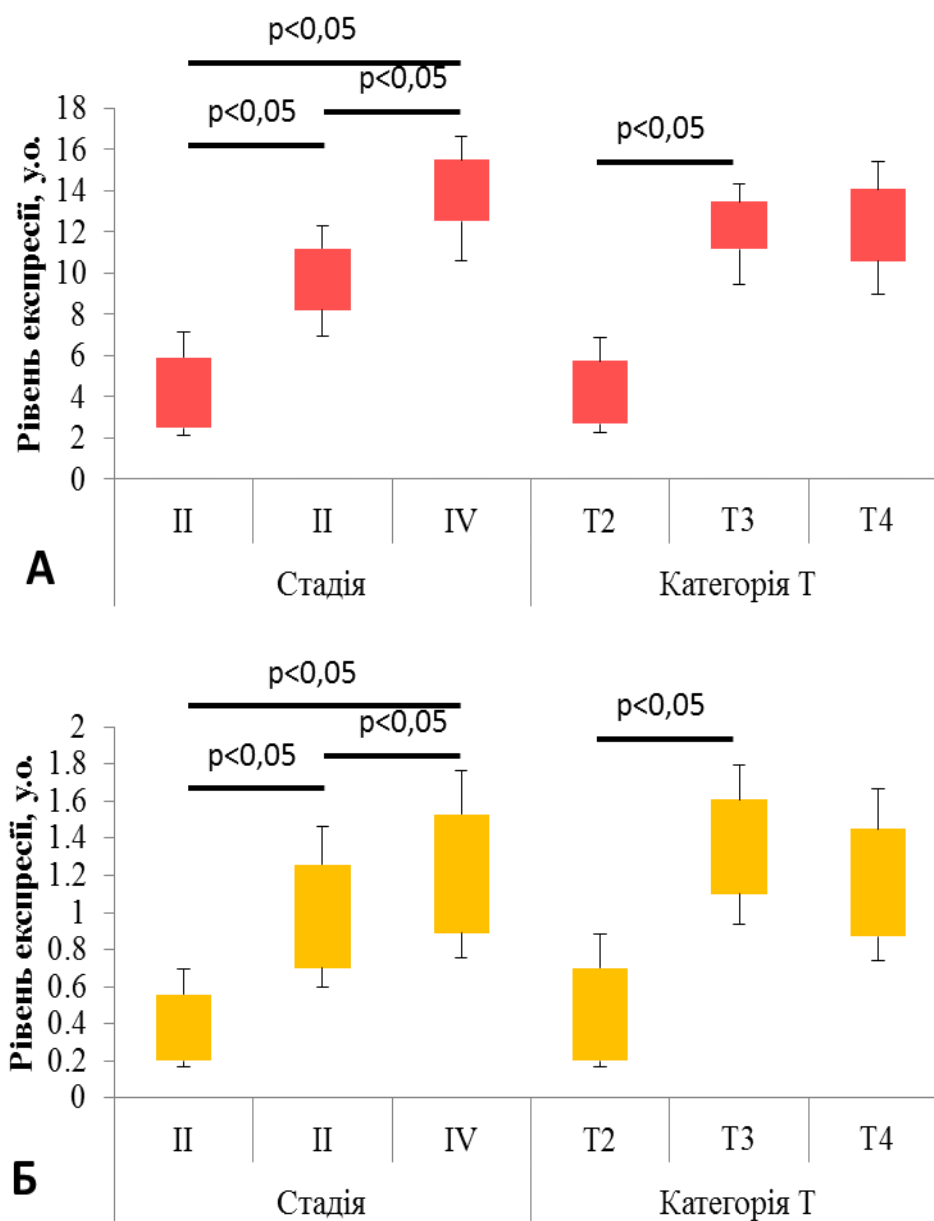


Рис. 6.1.1. Зв'язок рівня експресії циркулюючих мікроРНК-205(А) та мікроРНК-214 (Б) у зі стадією РПЗ та категорією Т за TNM.

Показано, що зростання експресії мікроРНК-205 та мікроРНК-214 в сироватці крові хворих на РПЗ асоціювалося зі збільшенням суми балів за Глісоном (Рис. 6.1.3) ($\rho = 0,39$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,45$; $p < 0,05$). Поряд з цим, визначено, існування зв'язку між показниками експресії досліджуваних

мікроРНК та доопераційним рівнем ПСА в сироватці крові хворих на РПЗ. Так, рівень мікроРНК-205 та мікроРНК-214 був достовірно вищим у хворих із значеннями ПСА більшими за 10нг/мл ($\rho = 0,48$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,52$; $p < 0,05$).

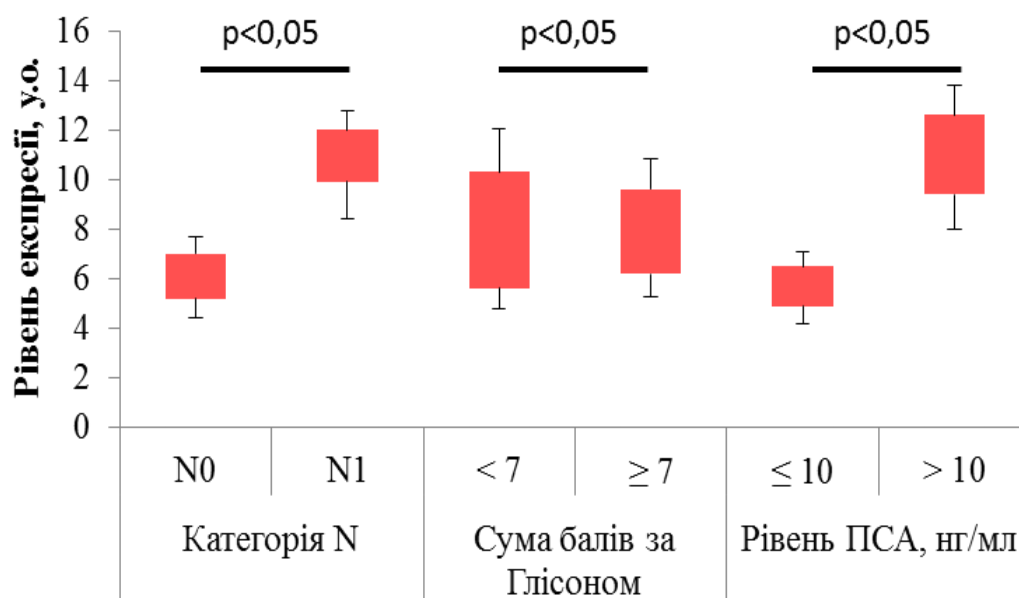


Рис. 6.1.2. Зв'язок рівня експресії циркулюючої мікроРНК-205 з категорією N за TNM, суммою балів за Глісоном і рівнем ПСА у хворих на РПЗ.

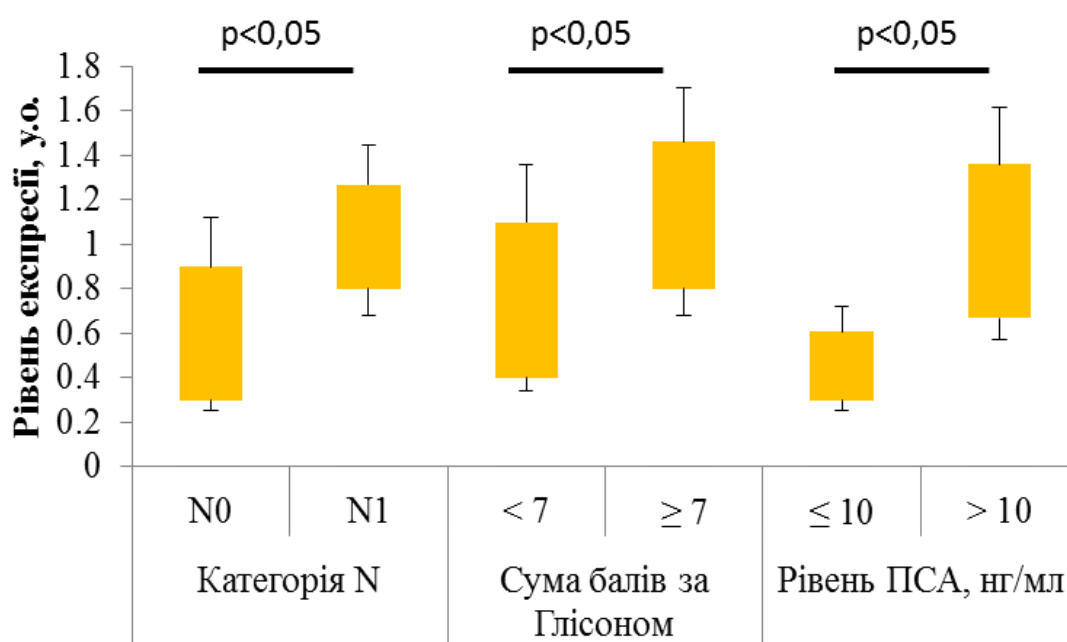


Рис. 6.1.3. Зв'язок рівня експресії циркулюючої мікроРНК-214 з категорією N за TNM, суммою балів за Глісоном і рівнем ПСА у хворих на РПЗ.

Наступним етапом нашої роботи стало дослідження експресії мікроРНК, що беруть участь у регуляції експресії ЛФ та ПСК пухлинній тканині хворих на РПЗ. Встановлено, що відносний рівень експресії та мікроРНК-214 був нижчим у тканині злоякісних новоутворень ПЗ у порівнянні із аналогічними показниками умовно нормальної тканини ПЗ. Натомість, показники мікроРНК-205 в пухлинній тканині хворих на РПЗ були в середньому у 3,0 рази вищими порівняно із контролем (Табл. 6.1.2).

Таблиця 6.1.2

Рівень експресії мікроРНК в пухлинній тканині хворих РПЗ

	Відносний рівень експресії мікроРНК у.о.	
	Контроль	РПЗ
МікроРНК-205	3,6 ± 1,21	10,85±1,3*
МікроРНК-214	1,98 ± 0,21	1,25±0,09*

Примітка.* $p < 0,05$ порівняно з умовно здоровою тканиною ПЗ

Отже, отримані нами результати свідчать про наявність асоціативних зв'язків між експресією досліджуваних мікроРНК та злоякісним ростом у ПЗ.

Як видно з результатів представлених на Рис.6.1.4 виявлено існування зв'язку між рівнем експресії досліджуваних мікроРНК та клінічною стадією захворювання. Показано, що рівні середніх показників мікроРНК -205 та -214 збільшувались із зростанням стадії РПЗ ($\rho = 0,47$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,52$; $p < 0,05$).

Аналогічні закономірності продемонстровано і при аналізі досліджуваних показників експресії мікроРНК в пухлинній тканині залежно від категорією Т за TNM. Показано, що збільшення розміру новоутворень супроводжувалось підвищенням рівня експресії мікроРНК-205 та мікроРНК-214 у 2,0 та 1,3 рази відповідно (Рис. 6.1.4.).

Показано наявність існування зв'язку між експресією досліджених мікроРНК у пухлинних клітинах з наявністю метастатичного ураження РЛВ у

хворих на РПЗ. Згідно результатів дослідження (Рис. 6.1.5), у хворих з метастазами рівень експресії мікроРНК-205 та мікроРНК-214 був у 1,9 та 1,3 рази вищим порівняно із хворими без метастазів ($1,93 \pm 0,16$ у.о., $7,30 \pm 0,87$ у.о. та $1,04 \pm 0,18$ у.о. відповідно) ($p = 0,42$; $p < 0,05$ та $p = 0,56$; $p < 0,05$).

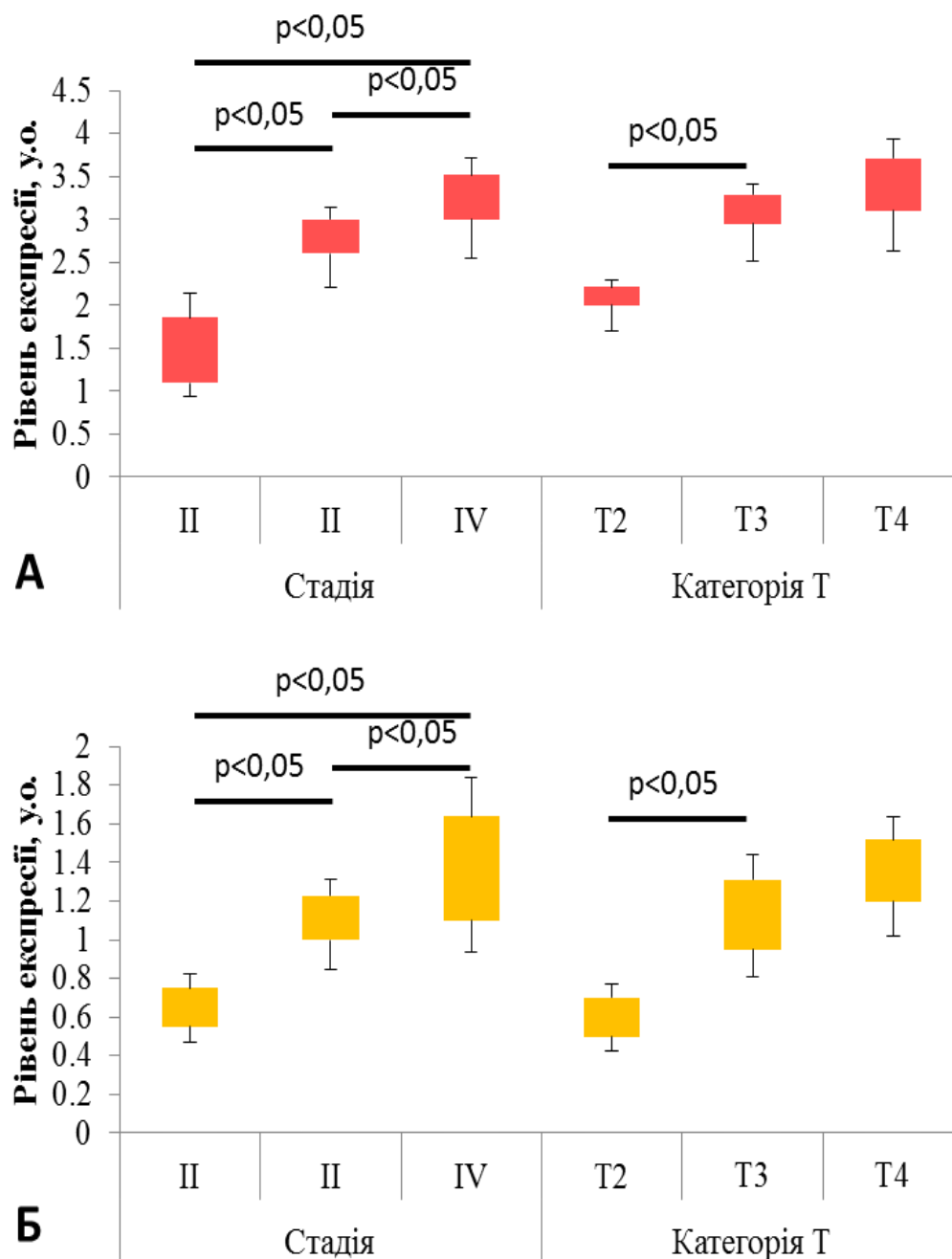


Рис. 6.1.4. Зв'язок рівня експресії пухлинно-асоційованих мікроРНК-205(А) та мікроРНК-214 (Б) у зі стадією РПЗ та категорією Т за TNM.

Встановлено, що середній рівень експресії мікроРНК-214 був у 1,3 рази вищим у групі пацієнтів з пухлинами більше 7 балів за Глісоном у порівнянні з

пухлинами із сумою балів за Глісоном меншою 7 ($p = 0,39$; $p < 0,05$). Визначено існування зв'язку експресії мікроРНК-205 в пухлинній тканині хворих на РПЗ зі ступенем диференціювання новоутворень ($p = 0,44$; $p < 0,05$) (Рис.6.1.5. та 6.1.6).

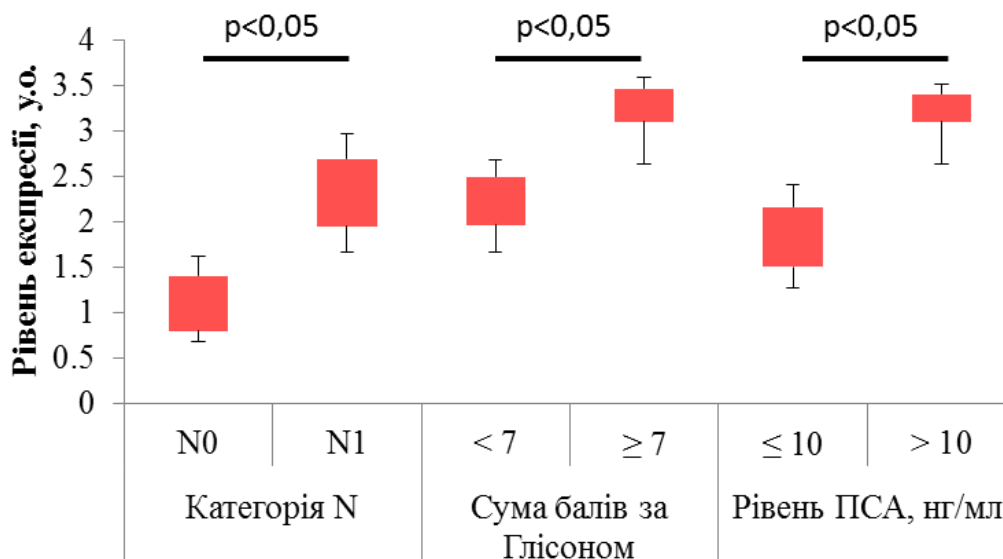


Рис. 6.1.5. Зв'язок рівня експресії пухлинно-асоційованої мікроРНК-205 з категорією N за TNM, суммою балів за Глісоном і рівнем ПСА у хворих на РПЗ

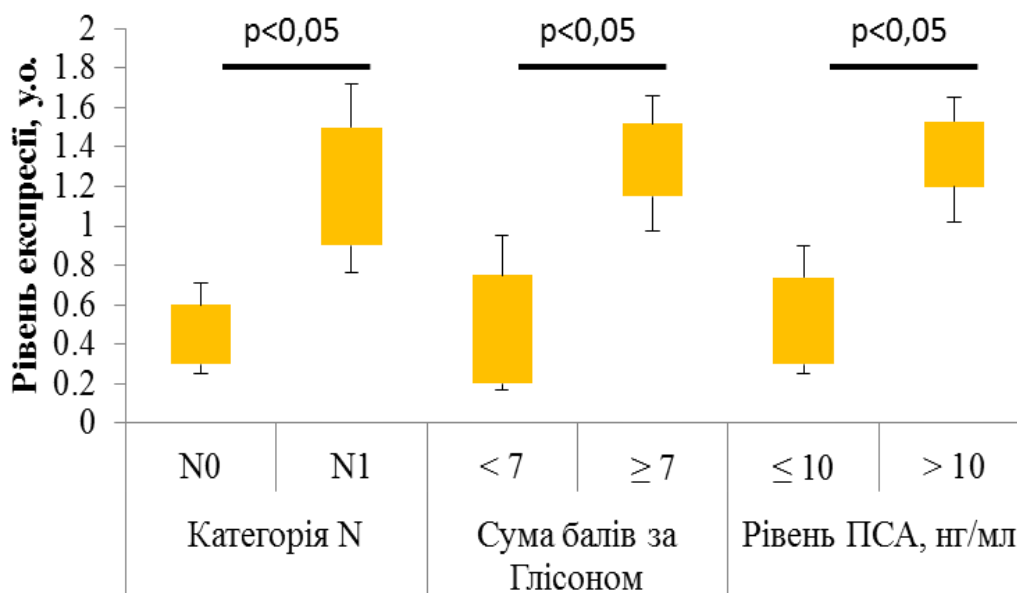


Рис. 6.1.6. Зв'язок рівня експресії пухлинно-асоційованої мікроРНК-214 з категорією N за TNM, суммою балів за Глісоном і рівнем ПСА у хворих на РПЗ.

Проведений аналіз показників експресії досліджуваних мікроРНК в пухлинній тканині залежно від рівня ПСА до оперативного втручання дозволив

встановити певні закономірності (Рис. 6.1.5. та 6.1.6.). Зокрема, нами визначено, що експресія мікроРНК-205 та мікроРНК-214 достовірно зростала із збільшенням концентрації ПСА в сироватці крові хворих на РПЗ у 1,7 та 1,3 разів, відповідно ($\rho = 0,57$; $p < 0,05$ та $\rho = 0,37$; $p < 0,05$).

Підсумки. Таким чином нами було встановлено, що розвиток злоякісних новоутворень у передміхуровій залозі супроводжується зміною співвідношення мікроРНК-205 та -214 як на рівні пухлини так і організму.

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

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.

Результати досліджень, викладені у Розділі 6, опубліковані у наступних роботах: 21, 204, 205.

РОЗДІЛ 7

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проблема РПЗ залишається актуальною внаслідок неухильного зростання показників захворюваності та смертності в усьому світі, а також у зв'язку з труднощами своєчасної діагностики та прогнозування клінічного перебігу пухлинного процесу [1, 33, 34]. Прихований перебіг хвороби, схильність до раннього метастазування — причини того, що частота виявлення РПЗ на стадії внутрішньозалозистого вогнища становить біля 10% [207, 208], коли одним із найбільш ефективних методів лікування є РПЕ. За даними літератури, від 29% до 59% випадків локалізованого РПЗ мають екстрапростатичне поширення при патоморфологічному дослідженні операційного матеріалу, що вказує на доцільність застосування ад'ювантної гормональної та променевої терапії [209]. РПЗ став першим онкологічним захворюванням, при якому у випадку наявності ознак розповсюдження чи метастазування було знайдено відносно ефективне консервативне лікування — метод андрогенної депривації, з початковою відповіддю близько 80% [193, 206, 209]. Проте, ефективність гормональної терапії носить тимчасовий характер, і у більшості пацієнтів розвивається гормонорезистентна форма захворювання. Гормонорезистентність РПЗ асоціюється зі збільшенням рівня ПСА на тлі проведення андрогенної блокади і радіологічних даних прогресії на тлі кастраційного рівня тестостерону. Вказана форма РПЗ вважається невиліковною, з середньою тривалістю життя пацієнтів 12-18 місяців [209].

Згідно з численними дослідженнями і теоретичними узагальненнями широкий діапазон клінічних проявів пухлинного процесу зумовлений клітинним поліморфізмом у межах однієї гістологічної форми і навіть молекулярних підтипів РПЗ. Встановлена гетерогенність пухлини – явище при якому окремі пухлинні клітини мають різні генетичні і фенотипові характеристики, на геномному, гістопатологічному та молекулярному рівнях,

виявлена як один із найбільш змішаних і складних факторів, що лежать в основі діагностики, прогнозу та лікування РПЗ. Незважаючи на досягнутий значний прогрес в дослідженні біології РПЗ протягом останнього десятиліття, до цього часу відсутня цілісна картина щодо ролі внутрішньо- та міжпухлинної гетерогенності у прогресуванні цього захворювання [8].

Сучасними клінічними показниками, що застосовуються в практиці є рівень ПСА, стадія пухлини за системою TNM та сума балів за шкалою гістологічної класифікації Глісона (індекс Глісона) [49].

Відкриття ПСА в якості сироваткового маркера новоутворень ПЗ зробило революцію в діагностиці РПЗ і на сьогодні він є єдиним широко використовуваним біомаркером для діагностики та прогнозування перебігу пухлинного процесу [210]. Відомо, що високі рівні ПСА з більшою вірогідністю вказують на поширення пухлини за межі капсули, інвазію сім'яних пухирців, а також про наявність метастатичного ураження тазових лімфатичних вузлів та/ або наявність віддалених метастазів. В той же час, остаточно доведено, що ПСА характеризується органоспецифічністю, але не канцероспецифічністю [212, 213]. Підвищення його рівня детектується при таких захворюваннях як ДГПЗ, простатит, ішемія та інфаркт ПЗ, що ускладнює диференційну діагностику злоякісного процесу, особливо при значеннях ПСА в «сірій зоні» 4-10 нг/мл. Між тим, є спостереження, що морфологічно верифікований РПЗ характеризується низьким рівнем ПСА. Таким чином, останній не може розглядатись як специфічний маркер РПЗ [212].

Поряд з цим, отримані суперечливі результати двох проспективних рандомізованих досліджень ERSPC і PLCO, в яких було показано, що існує потенційний ризик гіпердіагностики клінічно незначного раку [214], лікування якого призводить до серйозних негативних наслідків, включаючи імпотенцію і нетримання сечі (пов'язані з хірургічним втручанням), проблеми з кишечником (внаслідок застосування променевої терапії) та погіршення якості життя [215]. Наслідком цього стали дискусії про користь ранньої діагностики РПЗ і появи доводів проти скринінгу. З цих причин, в деяких країнах, зокрема, в Канаді, вже

відмовилися від використання в якості скринінгу діагностичного тесту на ПСА [214].

Основним гістологічним критерієм прогнозування РПЗ залишається оцінка ступеня диференціювання пухлини з використанням шкали Глісона, що дозволяє прогнозувати виживаність хворих. Однак ця система враховує тільки морфологію епітеліальної складової РПЗ і не завжди дозволяє адекватно оцінити інвазивний і метастатичний потенціал новоутворення [216]. Поряд з цим, часто спостерігається неправильна оцінка суми балів за шкалою Глісона (індекс Глісона), що обумовлено недостатньою кількістю інформації про об'єм, локалізацію і агресивність пухлини, а також залежить від кваліфікації патоморфолога.

Не зважаючи на те, що показник Глісона та рівень ПСА в сироватці крові становлять певну прогностичну цінність при лікуванні РПЗ, проте вони не можуть передбачити, яким виявиться перебіг захворювання – індолентним або агресивним [217]. Такі діагностичні можливості є надзвичайно актуальними, оскільки, згідно зі статистикою, п'ятирічна виживаність хворих на місцево-поширений РПЗ становить близько 88%, тоді як аналогічний показник у групі пацієнтів з діагностованою хворобою на метастазуючій стадії у 3 рази менший і становить тільки 29% [44].

Незважаючи на всебічні підходи щодо оптимізації діагностики, лікування та прогнозування пухлинного процесу, ці питання й досі не вирішені, що обумовлюють їх актуальність. Одним з них є фундаментальне обґрунтування механізмів віддаленого метастазування новоутворень різного генезу та з варіабельними молекулярно-біологічними властивостями, зокрема у кістки скелету [218].

Наведене визначає РПЗ як найбільш актуальну і надзвичайно важливу проблему онкології, що має як медичне, так і медико-соціальне значення. На сьогодні встановлено, що різноманітна клінічна картина РПЗ, відсутність у багатьох випадках позитивного ефекту після стандартних схем лікування у осіб одного віку з ідентичною поширеністю процесу, гістологічною формою та

ступенем диференціювання пухлини пов'язані із існуванням міжпухлинної та внутрішньопухлинної гетерогенності популяції злоякісно-трансформованих клітин. Успіхи молекулярної біології останніх років відкривають нові можливості для діагностики та лікування хворих на РПЗ, засновані на молекулярній та епігенетичній характеристиці кожної окремої пухлини. Складність дослідження і інтерпретація даних одночасного аналізу багатьох прогностичних чинників ускладнюють широке впровадження в практику отриманих результатів. Отже, основним завданням онкологів на сьогодні є визначення панелі найбільш значимих молекулярно-біологічних показників, що доповнюють один одного та асоціюються з патогенезом та агресивністю перебігу РПЗ.

Враховуючи зазначене, мета дисертаційної роботи полягала в ідентифікації молекулярно-біологічних та епігенетичних біомаркерів РПЗ людини, асоційованих із агресивністю перебігу пухлинного процесу.

Першим етапом нашої роботи стало дослідження фенотипових та молекулярно-біологічних ознак клітинних ліній РПЗ різного ступеня злоякісності в системі *in vitro*. З цією метою було використано 2 клітинні лінії: лінія DU-145 (отримана з метастазу аденокарциноми ПЗ в головний мозок) та LNCaP (отримана з метастазу у лівосторонній суглобовий лімфатичний вузол хворого на РПЗ). Ці культури є достатньо охарактеризованими та широко використовуються в наукових дослідженнях [220, 221].

Застосувавши комплекс методичних підходів нами, на основі таких біологічних характеристик як рецепторний статус, проліферативна та інвазивна активність, а також адгезивні властивості, клітини лінії DU-145 було віднесено до категорії високого ступеня злоякісності, а LNCaP – низького ступеня злоякісності. В клітинах обох досліджених ліній встановлено високий рівень експресії AR, ER β , низький рівень ER α та середній рівень PR. Отримані результати можна пояснити відмінностями молекулярного профілю цих клітин на посттрансляційному та білковому рівнях.

Вивчення протягом багатьох років патогенезу РПЗ показало важливу роль в даному процесі системного і локального статусу, балансу та метаболізму статевих гормонів, здатних виступати в якості ініціаторів та промоторів канцерогенезу [221]. Нами встановлено, що в клітинах обох ліній наявна експресія рецепторів статевих гормонів, які здатні безпосередньо взаємодіяти з певними ділянками геномної ДНК і активувати / блокувати транскрипцію таргетних генів [222]. Вважалося, що розвиток гормонорезистентності пов'язаний з втратою клітинами новоутворення AR, проте виявлений нами високий рівень їх експресії, характерний для клітин високого ступеня злоякісності лінії DU-145, підтверджують дані інших робіт, згідно яких експресія AR зберігається на всіх стадіях розвитку первинної пухлини ПЗ, має місце більше ніж в 80% її гормон-резистентних форм [145]. Зазначимо, що отримані результати наявності експресії AR в клітинах лінії DU-145 суперечать даним Edelstein RA et al. [224], та Bennett N.C. et al. [225], у роботах яких ці клітини визначаються як AR-негативні. Проте, Alimirah F et al у своєму дослідженні продемонстрували, що клітини даної лінії експресують мРНК AR [226].

Феномен інвазії і метастазування пухлинних клітин є наслідком набуття ними цілого ряду фенотипових характеристик. При цьому критична роль належить так званому "перемиканню" кадгеринів з епітеліального на мезенхімальний тип, тобто втраті експресії Е-кадгерину та підвищенню рівня N-кадгерину і потенційно інших мезенхімальних кадгеринів [227, 228]. Це призводить до ігібування інтерналізації FGFR1 з подальшою стимуляцією каскаду сигнальних шляхів PLCγ, PI3K і MAPK. Сигнальний шлях PLCγ / PI3K стимулює міграцію пухлинних клітин, в той час як сигнальний шлях MAPK підвищує експресію MMP-9 (матричної металопротеїнази 9) і активацію ERK1 / 2, які сприяють інвазії пухлинних клітин [229]. Нами було встановлено, що клітини ліній LNCaP та DU-145 суттєво відрізняються за проліферативною активністю, адгезивними та інвазивними властивостями. Високі показники експресії Ki-67 та CD44 на тлі високого ступеня інвазії визначено у лінії РПЗ

людини DU-145, що вказує на високий потенціал злоякісності цих клітин порівняно з клітинами лінії LNCaP. Визначений низький рівень експресії E-кадгерину в обох досліджуваних лініях вірогідно можна пояснити роллю інших молекул адгезії, залучених в процеси інвазії, а також різницею рівнів протеолітичних ферментів, які руйнують позаклітинний матрикс [230].

Поряд з цим, нами було встановлено, що клітинам лінії високого ступеня злоякісності DU-145 властиві фенотипові ознаки ПСК ($CD44^{high}CD24^{low}$), а також у 3,2 рази вищий рівень мРНК NANOG порівняно з клітинами низького ступеня злоякісності лінії LNCaP. Певні відмінності також визначено при вивченні особливостей експресії ЛФ у клітинах досліджених ліній РПЗ. Визначено, що клітини низького ступеня злоякісності лінії LNCaP характеризувалися середніми показниками експресії ЛФ, в той час як рівень експресії цього глікопротеїну в клітинах лінії високого ступеня злоякісності DU-145 був в 1,4 рази нижчим. Таким чином, нами доведено, що високий ступінь злоякісності клітин РПЗ людини асоціюється із наявністю клітин із фенотипом ПСК та низькими показниками експресії ЛФ.

З клінічної точки зору ПСК є відповідальними за розвиток пухлинного росту, його дисемінацію по організму, виникненню рецидивів та резистентності до хіміо- та променевої терапії [232]. Поряд з цим, існують повідомлення щодо зниження експресії ЛФ, яке може бути обумовлено порушенням співвідношення цикліну D1, p21 та p27, що викликає підвищення проліферативної активності клітин гормонозалежних злоякісних новоутворень.

Враховуючи важливе значення епігенетичної складової у формуванні ступеня злоякісності, на наступному етапі було 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, клітини високого ступеня злоякісності лінії DU-145 характеризувалися достовірно більшими показниками експресії онкогенних мікроРНК -21, -199a, -

205 та 214 та зниженням у 1,6 рази рівня онкосупресорної мікроРНК-320 порівняно з такими у клітинах LNCaP.

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.

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. Встановлені закономірності експресії ЛФ у клітинах різних морфологічних структур РПЗ співпадають з нечисельними даними літератури та підтверджують його участь у патогенезі цієї форми раку, що стало підґрунтям для проведення кількісної оцінки показників експресії зазначеного протеїну та дослідження його зв'язку з клініко-патологічними характеристиками хворих на РПЗ.

Вивчення кількісних показників експресії ЛФ показало, що клітини РПЗ характеризуються низьким рівнем цього протеїну, який визначався у 63,3% досліджених випадків. Рівень ЛФ був вищим у хворих на II стадію РПЗ, у пацієнтів із T2 і N₀ категоріями. 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. Доведено, що у хворих з відсутністю експресії ЛФ у пухлинних клітинах спостерігалось достовірне зниження показників дворічної безрецидивної виживаності на 22 %. Отримані нами дані щодо зниження рівня ЛФ у пухлинах більшості досліджених пацієнтів, а також встановлені зв'язки між експресією ЛФ та стадією розповсюдження хвороби, категоріями T і N за TNM та показниками безрецидивної виживаності хворих свідчать про асоціацію порушень цього протеїну зі злоякісним процесом у ПЗ та співпадають з даними літератури [179].

ЛФ це поліфункціональний білок, який відповідає за ряд фізіологічних і патологічних процесів, що включають гомеостаз заліза, морфогенез, імунну відповідь та пухлинна супресія [232, 233]. Основним механізмом дії ЛФ на пухлинні клітини є інгібування їх проліферації шляхом регуляції білків, пов'язаних з клітинним циклом, включаючи Akt, p21, p19, p27, Cdk2, циклін E, Cdk4 і циклін D1 [234, 235]. Саме тому, досить часто при виникненні та розвитку злоякісних новоутворень відбувається порушення його експресії [26, 236, 237]. Найбільш простим було б припущення про те, що ген ЛФ просто втрачається в результаті хромосомних перебудов, асоційованих з виникненням пухлинних клітин. Дійсно, ген ЛФ розташований в області 3p21.3, яка часто втрачається при асиметричних транслокаціях. Однак ці транслокації призводять лише до втрати гетерозиготності по локусу 3p21.3, а інактивація гена ЛФ головним чином відбувається за допомогою епігенетичних механізмів [238].

Певну новизну має фрагмент дослідження в системі *ex vivo* на клінічному матеріалі, присвячений вивченню зв'язку між наявністю ПСК у пухлинній тканині та клініко-патологічними особливостями РПЗ. Значна роль у формуванні ступеня злоякісності, як вважається, належить ПСК. Їх наявність, на сьогоднішній день, була виявлена у хворих на рак головного мозку, грудної залози, легень, шкіри, підшлункової залози, прямої кишки [114]. Для їх ідентифікації при РПЗ були досліджені декілька маркерів. Найперспективнішими і значимими серед них були: CD24 [115], CD44 [115], CD133 [116, 117], ALDH [118], $\alpha 2\beta 1$ -інтегрин [119]. Ці маркери були досліджені окремо і в декількох комбінаціях, але оптимальний набір досі не знайдений. Причиною такої ситуації є значна різноманітність гістологічних типів пухлин і їх генетична гетерогенність.

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 у пацієнтів з РПЗ IV стадії, пухлини в яких визначався високий індекс Глісона та проростали у навколишні тканини та органи.

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. 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 виходили за межі капсули органу, за наявності метастатичного ураження РЛВ, суми балів за Глісоном більшою ніж 7 та доопераційним рівнем ПСА більше 10 нг/мл. Таким чином, нами встановлено, що наявність клітин із фенотипом ПСК у пухлинній тканині асоціюється з несприятливим перебігом РПЗ, який за клініко-патологічними показниками відрізняється високим ступенем злоякісності, що підтверджується отриманими даними щодо зниження показників дворічної безрецидивної виживаності на 27 %.

Згідно даних літератури саме наявність клітин з фенотипом ПСК пов'язують з розвитком метастазів, виникненням рецидивів та резистентністю до терапії [239, 240]. В ПСК активованою є велика кількість внутрішньоклітинних сигнальних шляхів Wnt, NF- κ B (nuclear factor- κ B), Notch, Hedgehog, JAK-STAT, PI3K/AKT/mTOR, TGF/SMAD, та PPAR., а їх біологічна активність, як вважається, регулюється декількома плюрипотентними факторами транскрипції, такими як OCT4, Sox2, KLF4, MYC та Nanog [241].

Міжклітинні і клітинно-матриксних взаємодії вкрай важливі для підтримки і виживання ПСК при метастазуванні. В нашому дослідженні наявність клітин з фенотипом ПСК в тканині хворих на РПЗ асоціювалась із високою проліферативною активністю пухлинних клітин та порушенням їх адгезивних властивостей за рахунок зниження експресії Е-кадгерину та підвищення рівня N-кадгерину, що є характерною ознакою епітеліально-

мезенхімального переходу. Посилення процесів епітеліально-мезенхімального переходу трансформованими епітеліальними клітинами, як вважається, може призводити до збільшення частки ПСК в злоякісних пухлинах [242].

Продемонстровано, що наявність ПСК в пухлинній тканині хворих на РПЗ асоціюється з формуванням прозапального мікрооточення, що стимулює/може стимулювати ріст новоутворення. Отримані відомості цілком узгоджуються з уже наявною в літературі інформацією згідно якої ступінь злоякісності новоутворень визначається не лише в результаті зміни геному, а і під впливом мікрооточення [243].

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. Виявлено, що рівень експресії циркулюючих та пухлинно-асоційованих мікроРНК-205 та -214 був достовірно меншим у хворих на РПЗ II стадії, у хворих із категорією T2 та наявністю метастазів у РЛВ. 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 . 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.

Відомо, що виникнення і прогресія злоякісних новоутворень характеризуються порушення системи мікроРНК-залежного посттранскрипційного контролю генів, залучених в підтримання клітинного гомеостазу [23, 244]. Залежно від ролі у канцерогенезі всі мікроРНК розділені на онкогенні і онкосупресорні.

Згідно даних літератури, мікроРНК-205 залучена в процеси регуляції апоптозу, ангіогенезу, інвазії та метастазування і може виконувати як

онкосупресорну та онкогенну функції [16, 163, 245]. Імовірними мішенями, які були встановлені для цієї мікроРНК є *BCL-2*, *PKC*, *AR PKP3*, *IL6*, *CDH3*, *EDN1*, *FOS*, *IL-24*, *CYR61*, *EGR1* та *IL-18* [163]. До цього часу не існує єдиної думки щодо її ролі у канцерогенезі РПЗ. Згідно даних Srivastava A, et al. (2013) та Schaefer A, et al. (2010) [246, 247] гіперекспресія мікроРНК-205 асоційована з прогресією РПЗ, тоді як Tucci P, et al. (2012) вказують на її пухлино-супресорні функції [248].

МікроРНК-214 є одним з основних медіаторів дії 5a-ДГТ на клітини ПЗ при злоякісній трансформації [132]. Механізм дії мікроРНК-214 пов'язаний, ймовірно, з інгібуванням трансляції білка PTEN, що призводить до активації Akt сигнального шляху [249-252]. Також виявлено здатність мікроРНК-214 інгібувати експресію деяких онкогенів, наприклад MEK3 та JNK1 [253]. Гіперекспресія мікроРНК-214 може викликати пригнічення синтезу ЛФ [254], а також р53-опосередковано активувати NANOG, що в свою чергу призводить до ініціації ПСК [134].

Встановлена різниця між показниками експресії мікроРНК-214 в пухлинній тканині, а також їх рівнів в сироватці крові хворих на РПЗ та умовно-здорових донорів вказує на її участь розвитку та прогресії злоякісних новоутворень даного генезу. Отримані нами результати збігаються з уже наявними в науковій літературі [163, 255]. Варто відзначити, що не зважаючи на високий рівень мікроРНК-214 в сироватці рові хворих, в пухлинній тканині її показники були нижчими, ніж в контролі.

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 ПЗ 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. На підставі отриманих даних розроблено алгоритм прогнозування перебігу пухлинного процесу, що враховує молекулярно-біологічні ознаки, асоційовані зі ступенем злоякісності РПЗ(Рис. 7.1).

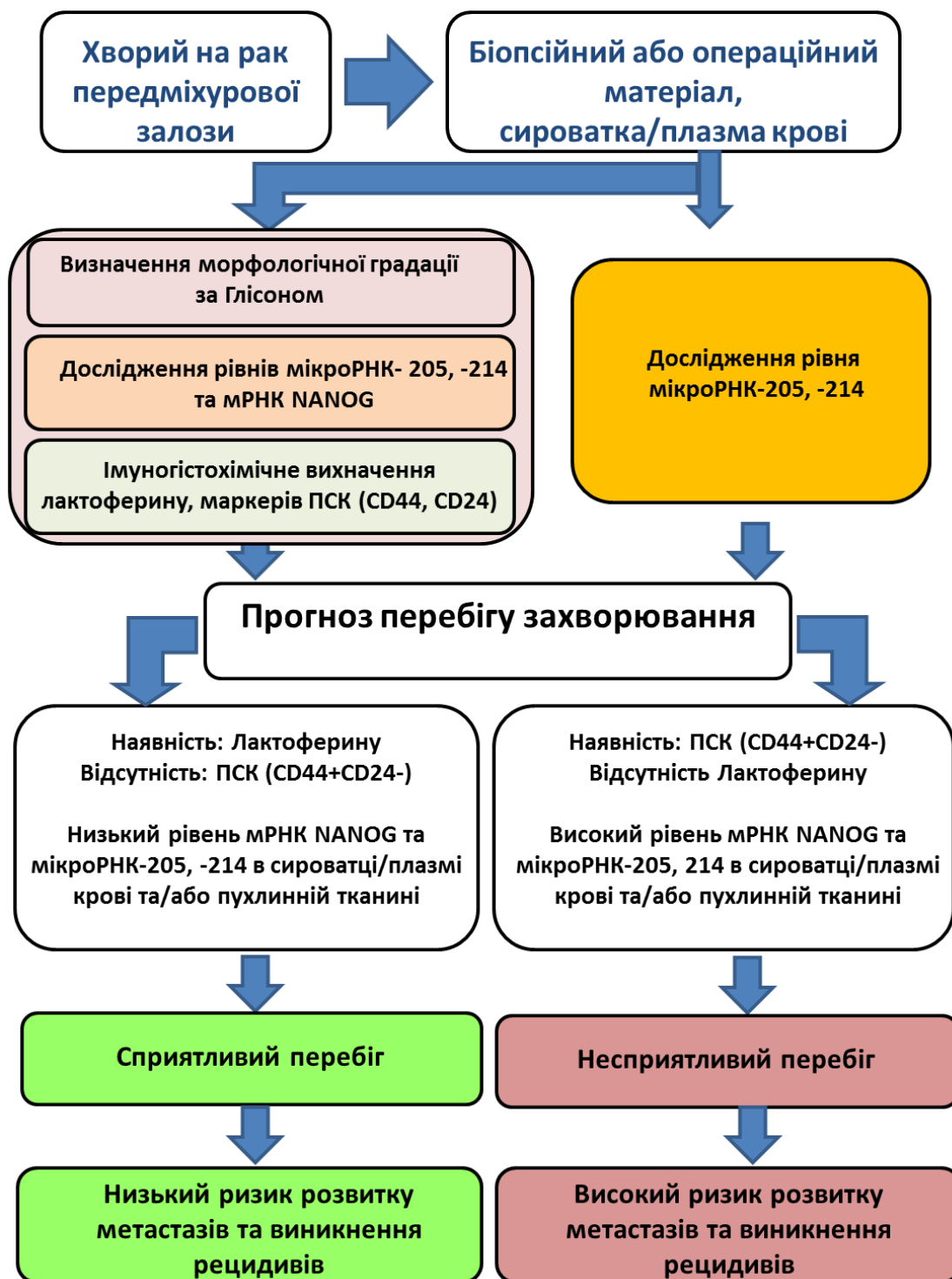


Рис. 7.1. Алгоритм прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на РПЗ

В результаті проведеного комплексного дослідження молекулярно-біологічних характеристик РПЗ в системах *in vitro* та *ex vivo* нами ідентифіковано ряд маркерів, що можуть бути використані для прогнозування перебігу захворювання. Отримані нами дані доповнюють вже існуючі уявлення про гетерогенність РПЗ. На основі їх аналізу було розроблено алгоритм прогнозування перебігу хворих РПЗ, що враховує ступінь злоякісності новоутворення, зумовлений його молекулярними особливостями (Рис. 7.1).

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 загальновизнаними 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 раза, $p<0,05$), мікроРНК-199а (у 2,4 раза, $p<0,05$), мікроРНК-205 (у 1,3 раза, $p<0,05$) та мікроРНК-214 (у 1,5 раза, $p<0,05$) та нижчий рівень експресії онкосупресорної мікроРНК-320а (у 1,6 раза, $p<0,05$) 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 ($CD44^{+/\text{high}}CD24^{-/\text{low}}$). 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 $4,18\pm0,65$ у.о. та виявлено кореляційний зв'язок між його рівнем та такими клініко-патологічними характеристиками РПЗ як доопераційний рівень ПСА в сироватці крові ($r=0,64$; $p<0,05$), категорія Т за TNM ($r=0,72$; $p<0,05$), наявність метастазів у РЛВ ($r=0,75$; $p<0,05$).

7. Загальна 2-річна безрецидивна виживаність хворих на РПЗ є достовірно меншою за наявності експресії маркерів ПСК ($CD44^{\text{high}}CD24^{\text{low}}$, 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rawla, P. (2019). Epidemiology of prostate cancer. *World journal of oncology*, 10(2), 63. doi:10.14740/wjon1191.
2. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492.
3. Федоренко З.П., Михайлович Ю.Й., Гулак Л.О., Горох С.Л., Рижов А.Ю., Сумкіна О.В. та ін. Рак в Україні, 2018–2019. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Гол. ред. Колеснік ОО. Бюлетень аціонального канцер-реєстру України №21. Київ: Національний інститут раку; 2020.
4. Стаховский, Э. А., Войленко, О. А., Витрук, Ю. В., Федоренко, З. П., Стаховский, А. Э., Кононенко, А. А. (2016). Профилактика рака предстательной железы. *Клиническая онкология*, (1), 47-49.
5. Gerashchenko, G. V., Kononenko, O. A., Bondarenko, Y. M., Stakhovsky, E. O., Kashuba, V. I. (2018). Expression patterns of genes that regulate lipid metabolism in prostate tumors. *Biopolymers and Cell*, 34(6):445-460. doi:10.7124/bc.000990.
6. Nekrasov, K. A., Vikarchuk, M. V., Rudenko, E. E., Ivanitskiy, I. V., Grygorenko, V. M., Danylets, R. O., Kashuba, V. I. (2019). gene promoter methylation assay is potentially applicable for prostate cancer clinical staging based on urine collection following prostatic massage. *Oncology Letters*, 18(6), 6917-6925. doi:10.3892/ol.2019.11015.
7. Нюшко, К. М., Лукьянова, Е. Н., Алексеев, Б. Я., Ефремов, Г. Д., Краснов, Г. С., Харитонов, С. Л., Кудрявцева, А. В. (2018). Идентификация прогностических маркеров местно-распространенного рака предстательной железы. *Онкология. Журнал им. ПА Герцена*, 7(6), 19-25. doi:10.17116/onkolog2018706119.

8. Yadav, S. S., Stockert, J. A., Hackert, V., Yadav, K. K., Tewari, A. K. (2018). Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 36(8), 349-360. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.05.008.
9. Shtivelman, E., Beer, T. M., Evans, C. P. (2014). Molecular pathways and targets in prostate cancer. *Oncotarget*, 5(17), 7217-7259. doi:10.18632/oncotarget.2406.
10. Bernal-Soriano, M. C., Parker, L. A., López-Garrigos, M., Hernández-Aguado, I., Caballero-Romeu, J. P., Gómez-Pérez, L., Alfayate-Guerra, R., Pastor-Valero, M., García, N., Lumbreras, B. (2019). Factors associated with false negative and false positive results of prostate-specific antigen (PSA) and the impact on patient health: Cohort study protocol. *Medicine*, 98(40), e17451. doi:10.1097/MD.00000000000017451.
11. Saini, S. (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology*, 39(2), 97-106. doi: 10.1007/s13402-016-0268-6.
12. Щербина, О. В. (2007). Роль опухолевых маркеров в диагностике рака предстательной железы и мониторинге больных. *Международный медицинский журнал*, 13(2), 89-95.
13. Chekhun, V. F., Lukianova, N. Y., Borikun, T. V., Bezdieniezhnykh, N. A., Shepelenko, I. V., Bazas, V. M., Klyusov, A. N. (2017). The clinical significance of tumor mir-122,-155,-182, and-200b expression in patients with breast cancer. *Science and innovation*, 13(5), 63-69. doi: 10.15407/scine13.05.063.
14. Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology letters*, 15(3), 2735–2742. doi:10.3892/ol.2017.7638.
15. N.Y. Lukianova, T.V. Borikun, V.F. Chekhun (2016). Effect of 5-azacytidine on mirna expression in human breast cancer cells with different sensitivity to cytostatics. *Experimental Oncology*, 38(1): 26–30.
16. Lukianova, N. Y., Borikun, T. V., Bazas, V. M., Andriiv, A. V., Klyusov, O. M., Yalovenko, T. M., Chekhun, V. F. (2020). Association of circulating miR-21,-205, and-182 with response of luminal breast cancers to neoadjuvant FAC and AC

- treatment. *Experimental Oncology*, 42(3), 162-166. doi:10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-3.14805.
17. Chekhun, V. F. (2019). MicroRNAs are a key factor in the globalization of tumor-host relationships. *Experimental Oncology*, 41(3), 188-194. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-41-no-3.13431.
 18. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
 19. Hoey, C., Ahmed, M., Ghiam, A. F., Vesprini, D., Huang, X., Commisso, K., He, H. H. (2019). Circulating miRNAs as non-invasive biomarkers to predict aggressive prostate cancer after radical prostatectomy. *Journal of translational medicine*, 17(1), 1-11. doi:10.1186/s12967-019-1920-5.
 20. Cozar, J. M., Robles-Fernandez, I., Rodriguez-Martinez, A., Puche-Sanz, I., Vazquez-Alonso, F., Lorente, J. A., Alvarez-Cubero, M. J. (2019). The role of miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 165-174. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.05.005.
 21. Лук'янова, Н.Ю., Борікун, Т.В., Базась, В.М., Яловенко, Т.М., Задворний, Т.В., Малишок Н.В., Россильна О.В. (2019). Циркулюючі мікрорнк: перспективи використання для ранньої діагностики та моніторингу перебігу пухлинного процесу. *Онкологія*, 21(3), 181-191. doi:10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.8001.
 22. Wang, B., Timilsena, Y. P., Blanch, E., Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(4), 580-596. doi:10.1080/10408398.2017.1381583.
 23. Chekhun, V. F., Storchai, D. M., Todor, I. N., Borikun, T. V., Lukianova, N. Y. (2018). Antitumor and genotoxic effects of lactoferrin in Walker-256 tumor-bearing rats. *Experimental oncology*.40(3), 200–204.
 24. Roseanu, A., Brock, J. H. (2006). What are the structure and the biological function of lactoferrin in human breast milk?. *IUBMB life*, 58(4), 235-237. doi:10.1080/15216540600577897.

25. Porter, C. M., Haffner, M. C., Kulac, I., Maynard, J. P., Baena-Del Valle, J. A., Isaacs, W. B., Sfanos, K. S. (2019). Lactoferrin CpG Island Hypermethylation and decoupling of mRNA and protein expression in the early stages of prostate carcinogenesis. *The American journal of pathology*, 189(11), 2311-2322. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.016.
26. Ieni, A., Barresi, V., Branca, G., Giuffrè, G., Rosa, M. A., Tuccari, G. (2013). Immunoexpression of lactoferrin in bone metastases and corresponding primary carcinomas. *Oncology letters*, 5(5), 1536-1540. doi:10.3892/ol.2013.1227.
27. van Sande, M., Van Camp, K. (1981). Lactoferrin in human prostate tissue. *Urological research*, 9(5), 241-244. doi:10.1007/BF00256894.
28. Chekhun, V. F., Lukianova, N. Y., Chekhun, S. V., Bezdieniezhnykh, N. O., Zadvorniy, T. V., Borikun, T. V., Klyusov, O. M. (2017). Association of cd44⁺ cd24⁻/low with markers of aggressiveness and plasticity of cell lines and tumors of patients with breast cancer. *Experimental Oncology*. 39(3), 203-211.
29. Harris, K. S., Kerr, B. A. (2017). Prostate cancer stem cell markers drive progression, therapeutic resistance, and bone metastasis. *Stem Cells International*, 2017, Article ID 8629234 doi:10.1155/2017/8629234.
30. Ni, J., Cozzi, P., Hao, J., Duan, W., Graham, P., Kearsley, J., Li, Y. (2014). Cancer stem cells in prostate cancer chemoresistance. *Current cancer drug targets*, 14(3), 225-240. doi: 10.2174/1568009614666140328152459.
31. Li, S., Goncalves, K. A., Lyu, B., Yuan, L., Hu, G. F. (2020). Chemosensitization of prostate cancer stem cells in mice by angiogenin and plexin-B2 inhibitors. *Communications biology*, 3(1), 1-18. doi: 10.1038/s42003-020-0750-6.
32. Leao, R., Domingos, C., Figueiredo, A., Hamilton, R., Tabori, U., Castelo-Branco, P. (2017). Cancer stem cells in prostate cancer: Implications for targeted therapy. *Urologia internationalis*, 99(2), 125-136. doi:10.1159/000455160.
33. Дідик, І. В. (2016). Рак передміхурової залози як світова проблема. Поширеність, фактори ризику, своєчасність діагностики (огляд літератури). *Укр. мед. часопис*, 3, 113, 62-64.

34. Піддубний, А. М. (2019). Порівняльний аналіз впливу простатолітів та *corrogaamylasea* на імунофенотип раку передміхурової залози. Вісник Вінницького національного медичного університету, 1, 64–69. doi:10.31393/reports-vnmedical-2019-23(1)-10.
35. Бюлетень Національного канцер-реєстру № 19 – «Рак в Україні, 2016-2017» / за ред. О. О. Колеснік. – 2018. – 134 с.
36. Рак в Україні, 2007–2008 : бюлетень Нац. канцер-реєстру. – К., 2009. – № 10. – 104 с.
37. Стаховский, Э. А., Федоренко, З. П., Витрук, Ю. В., Литвиненко, Р. А., Пикуль, М. В., Кононенко, А. А. (2016). Скрининг рака предстательной железы. Клиническая онкология, (1), 50-53.
38. Григоренко, В. М., Сайдакова, Н. О., Данилець, Р. О., Бровко, Н. В. (2014). Особливості демографічних показників населення України в аспекті поширення раку передміхурової залози. Науковий журнал МОЗ України, (1), 85-92.
39. Tolkach, Y., Kristiansen, G. (2018). The heterogeneity of prostate Cancer: a practical approach. Pathobiology, 85(1-2), 108-116. doi:10.1159/000477852.
40. Quinn, D. I., Henshall, S. M., Sutherland, R. L. (2005). Molecular markers of prostate cancer outcome. European Journal of Cancer, 41(6), 858-887. doi:10.1016/j.ejca.2004.12.035.
41. Налєскіна, Л. А., Лук'янова, Н. Ю., Чехун, В. Ф. (2017). Молекулярно-генетичні засади клінічної гетерогенності раку молочної залози (огляд літератури). Онкологія, 19(3), 171-179.
42. Канаева М.Д., Воробцова И.Е. (2015). Генетические маркеры предрасположенности к возникновению рака предстательной железы. Онкоурология, (3), 16-23. doi: 10.17650/1726-9776-2015-11-3-16-23.
43. Wallis, C. J., Nam, R. K. (2015). Prostate Cancer Genetics: A Review. EJIFCC, 26(2), 79–91. PMID: 27683484.
44. Водолажский, Д. И., Тимошкина, Н. Н. (2009). Молекулярно-генетические маркеры рака предстательной железы. Вестник южного научного центра РАН, 5(1), 36-52.

45. Северин, С. Е., Сивков, А. В., Кешишев, Н. Г., Кузнецова, Е. М., Шкабко, О. В. (2012). Роль молекулярно-генетических маркеров в скрининге рака предстательной железы: обзор литературы. Экспериментальная и клиническая урология, (3), 63-67.
46. Zhen, J. T., Syed, J., Nguyen, K. A., Leapman, M. S., Agarwal, N., Brierley, K., Shuch, B. (2018). Genetic testing for hereditary prostate cancer: Current status and limitations. *Cancer*, 124(15), 3105-3117. doi:10.1002/cncr.31316.
47. Farashi, S., Kryza, T., Clements, J., Batra, J. (2019). Post-GWAS in prostate cancer: from genetic association to biological contribution. *Nature Reviews Cancer*, 19(1), 46-59. doi:10.1038/s41568-018-0087-3.
48. Chen, R., Ren, S. Sun, Y. (2013). Genome-wide association studies on prostate cancer: the end or the beginning? *Protein Cell* 4, 677–686. doi:10.1007/s13238-013-3055-4.
49. Ракул С.А., Камилова Т.А., Голота А.С., Щербак С.Г. (2017). Прогностические и предиктивные биомаркеры рака предстательной железы (обзор литературы). *Онкоурология*, (4), 111-121. doi: 10.17650/1726-9776-2017-13-4-111-121.
50. Бова Ф.С., Кит О.И., Максимов А.Ю. (2019). Ассоциация экспрессии генов NFKB1, HIF1, VEGFA, vegfv, Вах, bcl2 с биохимическим рецидивированием у больных локализованным раком предстательной железы. *Research'nPracticalMedicineJournal*, 6 (3), 10-19. doi:10.17709/2409-2231-2019-6-3-1.
51. Имянитов, Е. Н. (2008). Эпидемиология и биология рака простаты. *Практическая онкология*, 9(2), 57-64.
52. Isaacs, W. B., Cooney, K. A., Xu, J. (2019). Updated insights into genetic contribution to prostate cancer predisposition: focus on HOXB13. *The Canadian journal of urology*, 26(5S2), 12-13.
53. Tu, S. M., Lin, S. H. (2012). Prostate cancer stem cells. *Clinical genitourinary cancer*, 10(2), 69-76. doi:10.1016/j.clgc.2012.01.002.

54. Wang, G., Wang, Z., Sarkar, F. H., Wei, W. (2012). Targeting prostate cancer stem cells for cancer therapy. *Discovery medicine*, 13(69), 135–142. PMID: 22369972.
55. Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Wong, K. Y. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics*, 38(4), 431-440. doi:10.1038/ng1760.
56. Gong, S., Li, Q., Jeter, C. R., Fan, Q., Tang, D. G., Liu, B. (2015). Regulation of NANOG in cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 54(9), 679-687. doi:10.1002/mc.22340.
57. Герштейн, Е. С., Кушлинский, Д. Н., Адамян, Л. В., & Кушлинский, Н. Е. (2016). МикроРНК как биологические маркеры рака яичников. *Молекулярная медицина*, 14(5), 3-14.
58. Palla, A. R., Piazzolla, D., Abad, M., Li, H., Dominguez, O., Schonthaler, H. B., Serrano, M. (2014). Reprogramming activity of NANOGP8, a NANOG family member widely expressed in cancer. *Oncogene*, 33(19), 2513-2519. doi:10.1038/onc.2013.196.
59. Wong, D. J., Liu, H., Ridky, T. W., Cassarino, D., Segal, E., Chang, H. Y. (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell stem cell*, 2(4), 333-344. doi:10.1016/j.stem.2008.02.009.
60. Jeter, C. R., Yang, T., Wang, J., Chao, H. P., Tang, D. G. (2015). Concise review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions. *Stem cells*, 33(8), 2381-2390. doi:10.1002/stem.2007.
61. Prado, M. M., Frampton, A. E., Stebbing, J., Krell, J. (2015). Gene of the month: NANOG. *Journal of clinical pathology*, 68(10), 763-765. doi:10.1136/jclinpath-2015-203238.
62. Григоренко, В. Н., Романенко, А. М., Базалицкая, С. В., Межеричский, С. Н., Данилец, Р. О., Викарчук, М. В., Сайдакова, Н. А. (2014). Молекулярные маркеры в прогнозировании биохимического рецидива рака предстательной железы после радикального хирургического лечения. *Онкология. Журнал им. ПА Герцена*, 3(6), 32-36. doi:10.17116/oncolog2014632-36.

63. Вторушин, С. В., Безгодова, Н. В., Плешкунов, А. А. (2017). Молекулярно-биологические факторы прогноза при раке предстательной железы. Сибирский онкологический журнал, 16(1), 82-90. doi:10.21294/1814-4861-2017-16-1-82-90.
64. Франк, Г. А. (2008). Морфология рака предстательной железы. Практическая онкология, 9(2), 65-70.
65. Самсонов Р.Б., Раджабова З.А., Чебуркин Ю.В., Ключе В.А., Ткаченко Е.В., Малек А.В. (2016). Эпигенетические механизмы регуляции генной экспрессии в развитии плоскоклеточного рака головы и шеи: терапевтические перспективы. Опухоли головы и шеи, (4), 35-44.
66. Чехун, В. Ф. (2008). Эпигенетика рака. Эпигенетика рака / В.Ф. Чехун // Онкология, 10(3), 301-302.
67. Diaw, L., Woodson, K., Gillespie, J. W. (2007). Prostate cancer epigenetics: a review on gene regulation. Gene regulation and systems biology, 1, GRSB-S398. doi:10.4137/GRSB.S398.
68. Балахин, С. М., Овсянко, Е. В., Осташевский, В. А., Бакарев, М. А. (2016). Эпигенетические маркеры рака предстательной железы. Современные проблемы науки и образования, (6), 215-215.
69. Chiyomaru T., Yamamura S., Fukuhara S. (2013) Genistein inhibits prostate cancer cell growth by targeting miR-34a and oncogenic HOTAIR. PLoS One, 8(8):e70372. doi: 10.1371/journal.pone.0070372.
70. Peng, Y., Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. Signal transduction and targeted therapy, 1(1), 1-9. doi:10.1038/sigtrans.2015.4.
71. Wadosky K.M., Koochekpour S. (2016). Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. Oncotarget, 7(39),64447–70. doi: 10.18632/oncotarget.10901.
72. Agaoglu, F. Y., Kovancilar, M., Dizdar, Y., Darendeliler, E., Holdenrieder, S., Dalay, N., Gezer, U. (2011). Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. Tumor Biology, 32(3), 583-588. doi:10.1007/s13277-011-0154-9.

73. Lodes, M. J., Caraballo, M., Suciu, D., Munro, S., Kumar, A., Anderson, B. (2009). Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PloS one*, 4(7), e6229. doi:10.1371/journal.pone.0006229.
74. Bryant, R., Pawlowski, T., Catto, J. W. F., Marsden, G., Vessella, R. L., Rhee, B., Hamdy, F. C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British journal of cancer*, 106(4), 768-774. doi:10.1038/bjc.2011.595.
75. Chen, Z. H., Zhang, G. L., Li, H. R., Luo, J. D., Li, Z. X., Chen, G. M., Yang, J. (2012). A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *The Prostate*, 72(13), 1443-1452. doi:10.1002/pros.22495.
76. Tsuchiyama, K., Ito, H., Taga, M., Naganuma, S., Oshinoya, Y., Nagano, K. I., Itoh, H. (2013). Expression of microRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer: miR-182-5p is a useful marker for high grade prostate cancer. *The Prostate*, 73(8), 827-834. doi:10.1002/pros.22626.
77. Casanova-Salas, I., Rubio-Briones, J., Calatrava, A., Mancarella, C., Masiá, E., Casanova, J., Domínguez-Escrig, J. (2014). Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *The Journal of urology*, 192(1), 252-259. doi:10.1016/j.juro.2014.01.107.
78. Watahiki, A., Macfarlane, R. J., Gleave, M. E., Crea, F., Wang, Y., Helgason, C. D., Chi, K. N. (2013). Plasma miRNAs as biomarkers to identify patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7757-7770. doi:10.3390/ijms14047757.
79. Zhang, H. L., Yang, L. F., Zhu, Y., Yao, X. D., Zhang, S. L., Dai, B., Ye, D. W. (2011). Serum miRNA-21: Elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *The prostate*, 71(3), 326-331. doi:10.1002/pros.21246.
80. Mahn, R., Heukamp, L. C., Rogenhofer, S., von Ruecker, A., Müller, S. C., Ellinger, J. (2011). Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology*, 77(5), 1265-e9. doi:10.1016/j.urology.2011.01.020.

81. Shen, J., Hruby, G. W., McKiernan, J. M., Gurvich, I., Lipsky, M. J., Benson, M. C., Santella, R. M. (2012). Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *The Prostate*, 72(13), 1469-1477. doi:10.1002/pros.22499.
82. Gonzales, J. C., Fink, L. M., Goodman Jr, O. B., Symanowski, J. T., Vogelzang, N. J., Ward, D. C. (2011). Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clinical genitourinary cancer*, 9(1), 39-45. doi:10.1016/j.clgc.2011.05.008
83. Сучков, С. В., Гнатенко, Д. А., Костюшев, Д. С., Крынский, С. А., Пальцев, М. А. (2013). Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии. *Вестник Российской академии медицинских наук*, 68(1), 65-71.
84. Шевченко, В. Е., Оленич, А. В., Арноцкая, Н. Е. (2015). Протеомика в открытии маркеров рака предстательной железы. *Успехи молекулярной онкологии*, (2), 17-28. doi:10.17 650 / 2313-805X. 2015.2.2.17–28.
85. Shariat, S. F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., Vickers, A. J., Bjartell, A. (2011). Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta oncologica*, 50(sup1), 61-75. doi:10.3109/0284186X.2010.542174
86. Principe, S., Kim, Y., Fontana, S., Ignatchenko, V., Nyalwidhe, J. O., Lance, R. S., Drake, R. R. (2012). Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses of expressed prostatic secretions in urine. *Journal of proteome research*, 11(4), 2386-2396. doi:10.1021/pr2011236.
87. Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New England Journal of Medicine*, 317(15), 909-916.
88. Filella, X., Foj, L., Augé, J. M., Molina, R., Alcover, J. (2014). Clinical utility of% p2PSA and prostate health index in the detection of prostate cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52(9), 1347-1355. doi:10.1515/cclm-2014-0027.

89. Rao, A. R., Motiwala, H. G., Karim, O. M. (2008). The discovery of prostate-specific antigen. *BJU international*, 101(1), 5-10. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07138.x.
90. Li, H., Tang, D. G. (2011). Prostate cancer stem cells and their potential roles in metastasis. *Journal of surgical oncology*, 103(6), 558-562. doi:10.1002/jso.21806.
91. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., Chu, T. M. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative urology*, 17(2), 159-163. PMID: 89106.
92. Черняев, В.А. (2011). Перспективы совершенствования серологической диагностики и оценки прогрессирования рака предстательной железы. *РМЖ*. 2011; 2: 57.
93. Tesfay, L., Clausen, K. A., Kim, J. W., Hegde, P., Wang, X., Miller, L. D., Babitt, J. L. (2015). Hepcidin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. *Cancerresearch*, 75(11), 2254-2263. doi:10.1158/0008-5472.can-14-2465.
94. Фомкин, Р. Н., Воронина, Е. С., Попков, В. М., Маслякова, Г. Н., Блюмберг, Б. И. (2013). Прогностическое значение молекулярно-биологических, морфологических и клинических маркеров в оценке эффективности лечения локализованного рака предстательной железы высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком. *Экспериментальная и клиническая урология*, (4), 29-33.
95. Bjartell, A., Montironi, R., Berney, D. M., Egevad, L. (2011). Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. *Acta Oncologica*, 50(sup1), 76-84. doi:10.3109/0284186x.2010.531284.
96. Paju, A., Hotakainen, K., Cao, Y., Laurila, T., Gadaleanu, V., Hemminki, A., Bjartell, A. (2007). Increased expression of tumor-associated trypsin inhibitor, TATI, in prostate cancer and in androgen-independent 22Rv1 cells. *European urology*, 52(6), 1670-1681. doi:10.1016/j.eururo.2007.01.096.
97. Повелица, Э. А., Вощула, В. И., Надыров, Э. А., Нуруллоев, Б. С. (2009). Диагностика доброкачественной гиперплазии, простатической

интраэпителиальной неоплазии предстательной железы с позиций современных молекулярно-биологических маркеров. *Новости хирургии*, 17 (4), 118-127.

98. Nemoto, R., Kawamura, H., Miyakawa, I., Uchida, K., Hattori, K., Koiso, K., Harada, M. (1993). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin in human prostate adenocarcinoma. *The Journal of urology*, 149(1), 165-169. doi:10.1016/S0022-5347(17)36031-7.

99. Limas, C., Frizelle, S. P. (1994). Proliferative activity in benign and neoplastic prostatic epithelium. *The Journal of Pathology*, 174(3), 201-208. doi:10.1002/path.1711740309.

100. Маршутина Н.В., Солохина М.П., Алентов И.И., Сергеева Н.С. (2016). Клиническая значимость биологических маркеров при раке яичников, раке предстательной железы, колоректальном раке. *Research'n Practical Medicine Journal*, 3 (1), 46-57. doi:10.17709/2409-2231-2016-3-1-7.

101. Steuber, T., Helo, P., Lilja, H. (2007). Circulating biomarkers for prostate cancer. *World journal of urology*, 25(2), 111-119. doi:10.1007/s00345-007-0160-0.

102. Курзанов, А. Н., Стрыгина, Е. А., Медведев, В. Л. (2016). Диагностические и прогностические маркеры рака предстательной железы. *Современные проблемы науки и образования*, (2), 166-166.

103. Князев, Е. Н., Фомичева, К. А., Нюшко, К. М., Каприн, А. Д., Алексеев, Б. Я., Шкурников, М. Ю. (2014). Актуальные вопросы молекулярной диагностики рака предстательной железы. *Онкоурология*, (4), 14-22.

104. Neto, A. S., Tobias-Machado, M., Wroclawski, M. L., Fonseca, F. L. A., Teixeira, G. K., Amarante, R. D. M., DelGiglio, A. (2010). Her-2/neu expression in prostate adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of urology*, 184(3), 842-850. doi: 10.1016/j.juro.2010.04.077.

105. Chen, C. D., Welsbie, D. S., Tran, C., Baek, S. H., Chen, R., Vessella, R., Sawyers, C. L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nature medicine*, 10(1), 33-39. doi: 10.1038/nm972.

106. Donovan, M. J., Osman, I., Khan, F. M., Vengrenyuk, Y., Capodieci, P., Koscuizka, M., Scher, H. I. (2010). Androgen receptor expression is associated with

prostate cancer-specific survival in castrate patients with metastatic disease. *BJU international*, 105(4), 462-467. doi: 10.1111/j.1464-410x.2009.08747.x.

107. Elzagheid, A., Buhmeida, A., Laato, M., EL-FAITORI, O. M. R. A. N., Syrjänen, K., Collan, Y., Pyrhönen, S. (2012). Loss of E-cadherin expression predicts disease recurrence and shorter survival in colorectal carcinoma. *Apmis*, 120(7), 539-548. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02863.x.

108. Umbas, R., Isaacs, W. B., Bringuier, P. P., Schaafsma, H. E., Karthaus, H. F., Oosterhof, G. O., Schalken, J. A. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancerresearch*, 54(14), 3929-3933.

109. Суконко О.Г., Ролевич А.И. Молекулярно-биологические маркеры рака предстательной железы (обзор литературы) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.uroweb.ru/news/955.html>.

110. Zhong, W., Peng, J., Wu, D., Han, Z., Bi, X., & Dai, Q. (2008). Ki-67 and PCNA expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clinical and investigative medicine*, E8-E15. doi: 10.25011/cim.v31i1.3136.

111. Tolonen, T. T., Tammela, T. L., Kujala, P. M., Tuominen, V. J., Isola, J. J., Visakorpi, T. (2011). Histopathological variables and biomarkers enhance the value of Ki-67 and minichromosome maintenance protein 7 as prognosticators in primarily endocrine-treated prostate cancer. *BJU international*, 108(9), 1430-1438. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10253.x.

112. Wolters, T., Vissers, K. J., Bangma, C. H., Schröder, F. H., Van Leenders, G. J. (2010). The value of EZH2, p27kip1, BMI-1 and MIB-1 on biopsy specimens with low-risk prostate cancer in selecting men with significant prostate cancer at prostatectomy. *BJU international*, 106(2), 280-286. doi: 10.1111/j.1464-410X.2009.08998.x.

113. Berney, D. M., Gopalan, A., Kudahetti, S., Fisher, G., Ambrosini, L., Foster, C. S., Gerald, W. (2009). Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic

Prostate Group study. *British journal of cancer*, 100(6), 888-893. doi: 10.1038/sj.bjc.6604951.

114. Маслюкова Е.А., Заброда С.И., Кoryтова Л.И., Пожарисский К.М., Раскин Г.А., Кoryтов О.В. (2015). Стволовые опухолевые клетки – новые горизонты в прогнозе течения рака молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы*. 11(3), 10-14. doi:10.17650/1994-4098-2015-11-3-10-14.

115. Hurt, E. M., Kawasaki, B. T., Klarmann, G. J., Thomas, S. B., Farrar, W. L. (2008). CD44⁺ CD24[–] prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *British journal of cancer*, 98(4), 756-765. doi: 10.1038/sj.bjc.6604242.

116. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*, 65(23), 10946-10951. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.

117. Vander Griend, D. J., Karthaus, W. L., Dalrymple, S., Meeker, A., DeMarzo, A. M., & Isaacs, J. T. (2008). The role of CD133 in normal human prostate stem cells and malignant cancer-initiating cells. *Cancer research*, 68(23), 9703–9711. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3084.

118. Li T, Su Y, Mei Y, Leng Q, Leng B, Liu Z, Stass SA, Jiang F. (2010). ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. *Lab Invest*, 90, 234–244. doi: 10.1038/labinvest.2009.127.

119. Chen, X., Li, Q., Liu, X., Liu, C., Liu, R., Rycaj, K., Lin, K. (2016). Defining a population of stem-like human prostate cancer cells that can generate and propagate castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(17), 4505-4516. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2956.

120. Пучинская, М. В., Крылов, Ю. В., Малашенко, С. В., Лесничая, О. В., & Крылов, А. Ю. (2016). Маркеры опухолевых стволовых клеток и их прогностическое значение. *Архив патологии*, 78(2), 47-54. doi: 10.17116/patol201678247-54.

121. Рябцева, О. Д., Лук'янова, Н. Ю., Чехун, В. Ф., & Поліщук, Л. З. (2011). Молекули адгезії та їх значення при розвитку злоякісних пухлин. *Онкологія*, 13(1), 4-11.
122. Несіна І. П., Юрченко Н. П., Горлакова О. О., Бучинська Л. Г. (2019). Експресія маркерів міжклітинної адгезії CD44 та CD24 у клітинах карцином ендометрія з високим потенціалом злоякісності. *Онкологія*, 21(3), 224-229. doi: 10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.7936.
123. Korski, K., Malicka-Durczak, A., & Bręborowicz, J. (2014). Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. *Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists*, 65(4), 291-295. doi: 10.5114/pjp.2014.48190.
124. Cremers, N., Neeb, A., Uhle, T., Dimmler, A., Rothley, M., Allgayer, H., Fodde, R., Sleeman, J. P., & Thiele, W. (2016). CD24 Is Not Required for Tumor Initiation and Growth in Murine Breast and Prostate Cancer Models. *PloS one*, 11(3), e0151468. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0151468.
125. Гойстер, О. С. (2015). Роль гена CD24 у розвитку пухлин різних органів та шляхи його вивчення. *Онкологія*, 17(4), 228-235.
126. Kristiansen, G., Sammar, M., & Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal of molecular histology*, 35(3), 255-262. doi: 10.1023/B:HIJO.0000032357.16261.c5.
127. Zhang, Y., Li, B., Zhang, X., Sonpavde, G. P., Jiao, K., Zhang, A., Wang, L. (2017). CD24 is a genetic modifier for risk and progression of prostate cancer. *Molecular carcinogenesis*, 56(2), 641-650. doi: 10.1002/mc.22522.
128. Zhang, Y., Lima, C. F., & Rodrigues, L. R. (2014). Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutrition reviews*, 72(12), 763-773. doi: 0.1111/nure.12155.
129. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. (2010). Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор). *Биофармацевтический журнал*, 2(3), 3-19.

130. Shaheduzzaman, S., Vishwanath, A., Furusato, B., Cullen, J., Chen, Y., Bañez, L., Chen, Y. (2007). Silencing of Lactotransferrin expression by methylation in prostate cancer progression. *Cancer biology & therapy*, 6(7), 1088-1095. doi: 10.4161/cbt.6.7.4327.
131. Zager, M. G., & Barton, H. A. (2012). A multiscale, mechanism-driven, dynamic model for the effects of 5 α -reductase inhibition on prostate maintenance. *PloS one*, 7(9), e44359. doi: 10.1371/journal.pone.0044359.
132. Narayanan, R., Jiang, J., Gusev, Y., Jones, A., Kearbey, J. D., Miller, D. D., Dalton, J. T. (2010). MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle. *PloS one*, 5(10), e13637. doi: 10.1371/journal.pone.0013637.
133. Liao, Y., Du, X., Lönnerdal, B. (2010). miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. *The Journal of nutrition*, 140(9), 1552-1556. doi: 10.3945/jn.110.124289.
134. Xu, C. X., Xu, M., Tan, L., Yang, H., Permuth-Wey, J., Kruk, P. A., Cheng, J. Q. (2012). MicroRNA miR-214 regulates ovarian cancer cell stemness by targeting p53/Nanog. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 34970-34978. doi: 10.1074/jbc.M112.374611.
135. McClelland, R. A., Wilson, D., Leake, R., Finlay, P., Nicholson, R. I., Group, B. Q. C. (1991). A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27(6), 711-715. doi: 10.1016/0277-5379(91)90171-9.
136. Fedchenko, N., Reifenrath, J. (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagnostic pathology*, 9, 221. doi:10.1186/s13000-014-0221-9.
137. Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology*, 95(1), 15-10. doi: 10.1002/0471142727.mb1510s95.
138. Torres, A., Torres, K., Wdowiak, P., Paszkowski, T., Maciejewski, R. (2013). Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecologic oncology*, 130(3), 588-594. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.06.026.

139. Xiang, M., Zeng, Y., Yang, R., Xu, H., Chen, Z., Zhong, J., Zeng, X. (2014). U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, 454(1), 210-214. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.064.
140. Mitsiades, N. (2013). A road map to comprehensive androgen receptor axis targeting for castration-resistant prostate cancer. *Cancer research*, 73(15), 4599-4605. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4414.
141. Hieronymus, H., & Sawyers, C. L. (2012). Traversing the genomic landscape of prostate cancer from diagnosis to death. *Nature genetics*, 44(6), 613-614. doi: 10.1038/ng.2301.
142. Heidegger, I., Massoner, P., Eder, I. E., Pircher, A., Pichler, R., Aigner, F., Klocker, H. (2013). Novel therapeutic approaches for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 138, 248-256. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.06.002.
143. Koochekpour, S. (2014). Biological and clinical significance of androgens and androgen receptor in prostate cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 10(6), 652–653. doi: 10.7150/ijbs.9576.
144. Резников, А. Г. (2014). Гормоны и рак: механизмы канцерогенеза, роста и резистентности к эндокринной терапии (обзор литературы и собственных исследований). *Журнал Національної академії медичних наук України*, 20(4), 426-438.
145. Linja, M. J., Savinainen, K. J., Saramäki, O. R., Tammela, T. L., Vessella, R. L., Visakorpi, T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, 61(9), 3550-3555.
146. Hobisch, A., Culig, Z., Radmayr, C., Bartsch, G., Klocker, H., & Hittmair, A. (1995). Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. *Cancer research*, 55(14), 3068-3072.
147. Saraon, P., Drabovich, A. P., Jarvi, K. A., Diamandis, E. P. (2014). Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer. *EJIFCC*, 25(1), 42–54.

148. Rubin, M. A., Mucci, N. R., Figurski, J., Fecko, A., Pienta, K. J., Day, M. L. (2001). E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Human pathology*, 32(7), 690-697. doi: 10.1053/hupa.2001.25902.
149. Jaggi, M., Rao, P. S., Smith, D. J., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hemstreet, G. P., Balaji, K. C. (2005). E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C μ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer research*, 65(2), 483-492.
150. Friedl, P., Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(7), 445-457. doi: 10.1038/nrm2720.
151. Jennbacken, K., Tešan, T., Wang, W., Gustavsson, H., Damber, J. E., Welén, K. (2010). N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, 17(2), 469-479. doi: 10.1677/ERC-10-0015.
152. Wang, G., Wang, Z., Sarkar, F. H., Wei, W. (2012). Targeting prostate cancer stem cells for cancer therapy. *Discovery medicine*, 13(69), 135–142.
153. Li, H., & Tang, D. G. (2011). Prostate cancer stem cells and their potential roles in metastasis. *Journal of surgical oncology*, 103(6), 558-562. doi: 10.1002/jso.21806.
154. Takayama, K. I., Misawa, A., Inoue, S. (2017). Significance of microRNAs in androgen signaling and prostate cancer progression. *Cancers*, 9(8), 102. doi: 10.3390/cancers9080102.
155. Konishi, N., Nakamura, M., Kishi, M., Nishimine, M., Ishida, E., Shimada, K. (2002). Heterogeneous methylation and deletion patterns of the INK4a/ARF locus within prostate carcinomas. *The American journal of pathology*, 160(4), 1207-1214. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62547-3.
156. Lau, K. M., LaSpina, M., Long, J., Ho, S. M. (2000). Expression of estrogen receptor (ER)- α and ER- β in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer research*, 60(12), 3175-3182.

157. Cannistraci, A., Di Pace, A. L., De Maria, R., Bonci, D. (2014). MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples. *BioMed research international*, 2014, 146-170. doi: 10.1155/2014/146170.
158. Кунсбаева, Г. Б., Гилязова, И. Р., Павлов, В. Н., Хуснутдинова, Э. К. (2015). Роль микроРНК в развитии рака предстательной железы. *Генетика*, 51(7), 737-737.
159. Waltering, K. K., Porkka, K. P., Jalava, S. E., Urbanucci, A., Kohonen, P. J., Latonen, L. M., Visakorpi, T. (2011). Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *The Prostate*, 71(6), 604-614. doi: 10.1002/pros.21276.
160. Rana, S., Malinowska, K., Zöller, M. (2013). Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia*, 15(3), 281-IN31. doi: 10.1593/neo.122010.
161. Малек, А. М., Берштейн, Л. М. (2015). МикроРНК: половые гормоны, гормональный канцерогенез, гормоночувствительность опухолевой ткани. *Успехи молекулярной онкологии*, (1). : 4-12.
162. Mishra, S., Deng, J. J., Gowda, P. S., Rao, M. K., Lin, C. L., Chen, C. L., Sun, L. Z. (2014). Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) expression in prostate cancer. *Oncogene*, 33(31), 4097-4106. doi: 10.1038/onc.2013.374.
163. Hagman, Z., Haflidadottir, B. S., Ceder, J. A., Larne, O., Bjartell, A., Lilja, H., Ceder, Y. (2013). miR-205 negatively regulates the androgen receptor and is associated with adverse outcome of prostate cancer patients. *British journal of cancer*, 108(8), 1668-1676. doi: 10.1038/bjc.2013.131.
164. Sun, X., Wu, W., Zheng, K., Chen, B., Tan, J. (2017). miR-199a and miR-34c enhance the migration of prostate cancer stem cells but inhibit migration of PC3 prostate cancer cells. *INT J CLIN EXP MED*, 10(4), 6791-6800.
165. Zadvornyi TV, Lukianova NY, Borikun TV, Chekhun, VF. (2018). Effects of exogenous lactoferrin on phenotypic profile and invasiveness of human prostate cancer cells (DU145 and LNCaP) in vitro. *Experimental oncology*, 40(3), 184–189.

166. 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, 39(3), 255
167. 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, Київ, 266-268.
168. 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, 249.
169. Zadvornyi T, Lukianova N, Chekhun V. 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.
170. Мушій ОМ, Задворний ТВ, Борікун ТВ. Особливості експресії маркерів адгезії в клітинах раку передміхурової залози людини. Матеріали XVII міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscienceadvances», 23-25 квітня, Київ, 2019, 137-138.
171. 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 / bioscienceadvances», 23-25 квітня 2019 р., Київ, - С. 139-140.
172. Manz, D. H., Blanchette, N. L., Paul, B. T., Torti, F. M., Torti, S. V. (2016). Iron and cancer: recent insights. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1368(1), 149-161. doi: 10.1111/nyas.13008.

173. Ludwig, H., Evstatiev, R., Kornek, G., Aapro, M., Bauernhofer, T., Buxhofer-Ausch, V., Koller, E. (2015). Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 127(23-24), 907-919. doi: 10.1007/s00508-015-0842-3.
174. Lobello, N., Biamonte, F., Pisanu, M. E., Faniello, M. C., Jakopin, Ž., Chiarella, E., Costanzo, F. (2016). Ferritin heavy chain is a negative regulator of ovarian cancer stem cell expansion and epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(38), 62019–62033. doi: 10.18632/oncotarget.11495.
175. Gruszevska, E., Cylwik, B., Gudowska, M., Kedra, B., Szmitkowski, M., Chrostek, L. (2016). Changes in transferrin isoforms in pancreatic cancer. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 46(3), 286-290.
176. Gibbons, J. A., Kanwar, R. K., Kanwar, J. R. (2011). Lactoferrin and cancer in different cancer models. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 1080-1088.
177. Толченицин, И. А., Лыкова, О. Ф., Мальцева, Н. В. (2004). Уровень лактоферрина в сыворотке крови при воспалительных, предопухолевых и злокачественных поражениях губ. *Сибирский научный медицинский журнал*, (4), 103-106.
178. Mason, D. Y., Taylor, C. R. (1978). Distribution of transferrin, ferritin, and lactoferrin in human tissues. *Journal of Clinical Pathology*, 31(4), 316-327. doi: 10.1136/jcp.31.4.316.
179. Tuccari, G., Barresi, G. (2011). Lactoferrin in human tumours: immunohistochemical investigations during more than 25 years. *Biometals*, 24(5), 775-784. doi: 10.1007/s10534-011-9450-5.
180. Sfanos, K. S., Wilson, B. A., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B. (2009). Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3443-3448. doi: 10.1073/pnas.0810473106.
181. Legrand, D. (2016). Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *The Journal of pediatrics*, 173, S10-S15. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.02.071.

182. Ponka, P., Herbert M. Schulman, Robert C. Woodworth, Goetz W. Richter (2000). Iron transport and storage. CRC Press.
183. Chekhun VF, Lukianova N Yu, Polishchuk LZ, Nalieskina LA, Zadvorniy TV, Storchai DM, Todor IN, Sobchenko SO, Demash DV, Yalovenko TM, Borikun TV, Lozovska YuV, Vitruk YuV, Chepurnatyi MV, Pikul MV, Stakhovsky OE, Voilenko OA, Stakhovsky EO. The role of lactoferrin expression in initiation and progression of most common hormone-dependent cancers. Horizons in Cancer Research 2017; 66(3), 51-85.
184. Lozovska YuV, Naleskina LA, Zadvorniy TV, Andrusishina IM, Zhulkevych IV, Stakhovskiy EO, Kunska LM, Lukianova NYu. Relationship aggressiveness of prostate cancer with tumor-associated serum markers. Fiziologichnyi Zhurnal 2019, 65(6), 70-80.
185. Спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на рак передміхурової залози. Інформаційний лист / Чехун ВФ, Лук'янова Н.Ю, Т.В. Задворний // Київ. – МОЗ України. – 2018. - № 353.
186. Чехун ВФ, Лук'янова НЮ, Поліщук ЛЗ, Задворний ТВ, Собченкою СО, Вітрук ЮВ, Чепурнатий МВ, Стаховський ОЕ, Войленко ОА, Стаховський ЕО (2015). 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, Яремче. Онкология, 17(3), 199.
187. Задворний ТВ, Кононенко ОА, Пікуль МВ, Чепурнатий МВ, Стаховський ОЕ. 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, Київ. Клиническая онкология, 2, 68
188. ChekhunVF, ZadvorniyTV, LukianovaNYu, StakhovskyAE, StakhovskyEA, VitrukYuV. Features of lactoferrin expression in malignant and non-malignant prostate tumors. 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference, September 3-7, 2016, Štrbské Pleso. p79.

189. Лукьянова НЮ, Полищук ЛЗ, Задворний ТВ, Собченко СА, Чепурнатый МВ, Стаховский АЭ, Витрук ЮВ, Войленко ОА, Стаховский ЭА, Чехун ВФ. 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, Минск. Евразийский онкологический журнал, 2(4), 306.
190. Чехун ВФ, Задворний ТВ, Поліщук ЛЗ, Лук'янова НЮ, Вітрук ЮВ, Кононенко ОА, Литвиненко РА, Пікуль МВ, Чепурнатий МВ, Стаховський ОЕ, Стаховський ЕО. Дослідження експресії лактоферину в доброякісних і злоякісних пухлинах передміхурової залози. XIII з'їзд онкологів та радіологів України, 26-28 травня 2016, Київ. Український радіологічний журнал. Спец. вип. 1, 210.
191. Дослідження зв'язку експресії лактоферину з клініко-патологічними характеристиками хворих на рак передміхурової залози. Тіщенко ВВ, Задворний ТВ, Лук'янова НЮ, Чехун ВФ. Матеріали XVI міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscienceadvances», 24-27 квітня 2018, Київ. 271-272.
192. Vorobei PM, Zadvornyi TV, Lukianova NYu, Chepurnatiy MV. 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, 38.
193. Бабаев, Э. Р., Матвеев, В. Б., Волкова, М. И. (2011). Факторы прогноза выживаемости больных распространенным раком предстательной железы, получающих гормонотерапию. Онкоурология, (2), 78-84.
194. Datta, K., Muders, M., Zhang, H., Tindall, D. J. (2010). Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. Future oncology (London, England), 6(5), 823–836. doi:10.2217/fon.10.33.
195. Zhylchuk YuV, Vozianov SO, Zadvornyi TV, Sakalo VS, Sakalo AV, Grygorenko VN, Lukianova NYu, Chekhun VF (2017) Prognostic value of cancer

stem cell markers (CD44 and CD24) in combination with clinical and morphological characteristics of prostate cancer. *Ijsrm Human*,. 6(3), 20-30.

196. Zadvornyi TV, Lukianova NY, Borikun TV, Vitruk YuV, Stakhovsky EO, Chekhun VF (2020). NANOG as prognostic factor of prostate cancer course. *Experimental Oncology*, 42(2) 94-100.

197. Жильчук ЮВ, Сакало ВС, Григоренко ВМ., Сакало АВ, Задворний ТВ, Лук'янова НЮ, Чехун ВФ (2016). Експресія CD44 та CD24 у пухлинній тканині у хворих на рак передміхурової залози. *Здоров'є людини*, 4, 111-114.

198. 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.

199. Задворний ТВ, Жильчук ЮВ, Сакало ВС, Чехун ВФ. 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, 196.

200. ChekhunVF, ZhylchukYuV, ZadvornyiTV, LukianovaNYu., LytvynenkoRA, VitrukYuV, PikulMV, StakhovskyAE, StakhovskyEA. Pattern of expression of cancer stem cells markers, CD44 and CD24, in malignant prostate tumors. *Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer: Intern. Sci. Conf.: Abstr.*, June13-15, 2016, Kyiv. *Experimental Oncology*, 38(2), 131.

201. Chekhun VF, Zadvornyi TV, Lukianova NY. 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, 112.

202. Дядюк К, Задворний Т. 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 / bioscienceadvances», 23-25 квітня 2019 р., Київ, 2019, 128-130.

203. Задворний ТВ, Лук'янова НЮ, Чехун ВФ. 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, 21(3), 67-68.
204. Задворний ТВ, Борікун ТВ, Лук'янова НЮ, Вітрук ЮВ, Стаховський ЕО (2019). МікроРНК-126, -205, -214 при доброякісних і злоякісних новоутвореннях передміхурової залози: обґрунтування можливого діагностичного та прогностичного значення. Онкологія, 21(1), 10-16.
205. Задворний ТВ. 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, 21(1), 62-63.
206. Бідованець, Ю. (2006). Досвід консервативної терапії хворих на рак передміхурової залози. Онкологія, 8(3), 233-234.
207. Петров, С. Б., Ракул, С. А., & Галимов, Р. Д. (2008). Хирургическое лечение рака предстательной железы. Практическая онкология, 9(2), 83-89.
208. Григоренко, В. М., Романенко, А. М., Базалицька, С. В., Межерицький, С. М., Данилець, Р. О., Вікарчук, М. В., Сайдакова, Н. О. (2014). Нові імуногістохімічні маркери раку передміхурової залози в прогнозуванні виникнення біохімічного рецидиву після радикальної простатектомії. Здоров'є людини, (2), 110-116.
209. Шаплыгин, Л. В., Соловов, В. А., Воздвиженский, М. О., Фесенко, Д. В., Копылов, А. В. (2012). Высокоинтенсивная фокусированная ультразвуковая абляция в лечении гормонорезистентного локализованного и местнораспространенного рака предстательной железы. Сибирский онкологический журнал, (2), 18-21.

210. YadavSS, StockertJA, HackertV, YadavKK, TewariAK. (2018). Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol Oncol.* 36(8):349-360. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.05.008.
211. Terada, N., Akamatsu, S., Kobayashi, T., Inoue, T., Ogawa, O., Antonarakis, E. S. (2017). Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic advances in medical oncology*, 9(8), 565-573.
212. Возіанов, С. О., Слободянюк, В. А. (2008). Нові технології в ранній діагностиці раку передміхурової залози. *Патологія*, 5(2), 125-125.
213. Heidegger, I., Klocker, H., Pichler, R., Horninger, W., Bektic, J. (2015). PSA isoforms' velocities for early diagnosis of prostate cancer. *Anticancer research*, 35(6), 3567-3570.
214. Барчук А.А. (2017). Перспективы популяционного скрининга рака предстательной железы. *Демографическое обозрение*, 4 (3), 181-189.
215. McCaffery, K., Nickel, B., Pickles, K., Moynihan, R., Kramer, B., Barratt, A., Hersch, J. (2019). Resisting recommended treatment for prostate cancer: a qualitative analysis of the lived experience of possible overdiagnosis. *BMJ open*, 9(5), e026960. doi:10.1136/bmjopen-2018-026960.
216. А. К. Гриб, В. А. Басинский (2007). Оценка прогностической роли уровня экспрессии гладкомышечного актина в раке предстательной железы. *Проблемы здоровья и экологии*, (2), 106-110.
217. Попов С.В., Стуров Н.В., Воробьев Н.В., Хайдуков С.В (2019). Роль Т-регуляторных клеток в прогрессировании рака предстательной железы. *Медицинская иммунология*, 21 (4), 587-594.
218. Бычкова, Н. М., Хмелевский, Е. В. (2016). Особенности метастатического поражения костей при различных первичных опухолях и их значение для дистанционной лучевой терапии. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*, 5(6), 12-20. doi:10.17116/onkolog20165612-20.
219. Choi, Y. J., Choi, Y. K., Lee, K. M., Cho, S. G., Kang, S. Y., Ko, S. G. (2016). SH003 induces apoptosis of DU145 prostate cancer cells by inhibiting ERK-involved

pathway. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 507. doi:10.1186/s12906-016-1490-5.

220. Yadav, S. S., Li, J., Stockert, J. A., Herzog, B., O'Connor, J., Garzon-Manco, L., Parsons, R., Tewari, A. K., Yadav, K. K. (2017). Induction of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Cells by Dovitinib (TKI-258) and its Therapeutic Implications. Transl Oncol, 10(3), 357–366. doi:10.1016/j.tranon.2017.01.011.

221. Смолякова, Р. М. (2017). Молекулярно-биологические критерии диагностики и прогнозирования рака предстательной железы. Экологический вестник, 2(40), 80-86.

222. Gadaleta RM, Magnani L.(2014). Nuclear receptors and chromatin: an inducible couple. J Mol Endocrinol. 52(2):R137-49. doi: 10.1530/JME-13-0170.

223. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramäki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. 61(9):3550-5. PMID: 11325816.

224. Edelstein, R. A., Carr, M. C., Caesar, R., Young, M., Atala, A., Freeman, M. R. (1994). Detection of human androgen receptor mRNA expression abnormalities by competitive PCR. DNA and cell biology, 13(3), 265-273. doi:10.1089/dna.1994.13.265

225. Bennett, N. C., Hooper, J. D., Johnson, D. W., Gobe, G. C. (2014). Expression profiles and functional associations of endogenous androgen receptor and caveolin-1 in prostate cancer cell lines. The Prostate, 74(5), 478-487. doi:10.1002/pros.22767.

226. Alimirah, F., Chen, J., Basrawala, Z., Xin, H., Choubey, D. (2006). DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. FEBS letters, 580(9), 2294-2300.

227. Wong, A. S., Gumbiner, B. M. (2003). Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. The Journal of cell biology, 161(6), 1191–1203. doi:10.1083/jcb.200212033.

228. Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Looi, C. Y. (2019). The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-

mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*, 8(10), 1118. doi:10.3390/cells8101118.

229. Walker, A., Frei, R., Lawson, K. R. (2014). The cytoplasmic domain of N-cadherin modulates MMP-9 induction in oral squamous carcinoma cells. *IntJ Oncol*, 45(4), 1699-1706. doi:10.3892/ijo.2014.2549.

230. Мнихович, М. В. (2013). Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в опухолях: современное состояние проблемы. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*, (3), 161-171.

231. Сагакянц, А. Б., Франциянц, Е. М., Златник, Е. Ю., Ульянова, Е. П., Бондаренко, Е. С., Шульгина, О. Г., Каймакчи, Д. О. (2018). Биологические свойства и некоторые клинические аспекты опухолевых стволовых клеток: современное состояние проблемы. *Современные проблемы науки и образования*, (4), 241-241.

232. Rodrigues, L., Teixeira, J., Schmitt, F., Paulsson, M., Månsson, H. L. (2008). Lactoferrin and cancer disease prevention. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(3), 203-217. doi:10.1080/10408390701856157.

233. Drago-Serrano, M. E., Campos-Rodriguez, R., Carrero, J. C., de la Garza, M. (2018). Lactoferrin and peptide-derivatives: antimicrobial agents with potential use in nonspecific immunity modulation. *Current Pharmaceutical Design*, 24(10), 1067-1078. doi: 10.2174/1381612824666180327155929.

234. Cutone, A., Rosa, L., Ianiro, G., Lepanto, M. S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Valenti, P., Musci, G. (2020). Lactoferrin's Anti-Cancer Properties: Safety, Selectivity, and Wide Range of Action. *Biomolecules*, 10(3), 456. doi: 10.3390/biom10030456.

235. Chea, C., Miyauchi, M., Inubushi, T., Febriyanti Ayuningtyas, N., Subarnbhesaj, A., Nguyen, P. T., Takata, T. (2018). Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. *PloS one*, 13(1), e0191683.

236. Giuffrè, G., Barresi, V., Skliros, C., Barresi, G., Tuccari, G. (2007). Immunoexpression of lactoferrin in human sporadic renal cell carcinomas. *Oncology reports*, 17(5), 1021-1026.
237. Gopal, S. H., Das, S. K. (2016). Role of Lactoferrin in the Carcinogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of cancer clinical trials*, 1(3), e105.
238. Teng, C. T. (2002). Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 7-16.
239. Ayob, A.Z., Ramasamy, T.S. (2018) Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci* 25, 20. doi:10.1186/s12929-018-0426-4.
240. Afify, S. M., Seno, M. (2019). Conversion of stem cells to cancer stem cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers*, 11(3), 345. doi:10.3390/cancers11030345.
241. Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J. Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-35. doi:10.1038/s41392-020-0110-5.
242. Титов К.С., Оганесян А.П., Ротин Д.Л., Рябчиков Д.А., Лепкова Н.В. Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы. Роль в патогенезе и подходы к терапии. *Злокачественные опухоли*. 2016;(2):22-27. doi:10.18027/2224-5057-2016-2-22-27
243. Jia, Z., Zhu, J., Zhuo, Y., Li, R., Qu, H., Wang, S., Cai, Z. (2019). Offsetting Expression Profiles of Prognostic Markers in Prostate Tumor versus its Microenvironment. *Frontiers in oncology*, 9, 539. doi:10.3389/fonc.2019.00539.
244. Шуленина, Л. В., Михайлов, В. Ф., Васильева, И. М., Салеева, Д. В., Незнанова, М. В., Засухина, Г. Д. (2019). Профили экспрессии генов и некодирующих рнк в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*, (1), 103-111.

245. Никитина, Е. Г., Уразова, Л. Н., Черемисина, О. В., Кульбакин, Д. Е., Стегний, В. Н. (2014). Вариабельность и уровень экспрессии микроРНК в ткани опухолей головы и шеи. Сибирский онкологический журнал, (3), 28-33.
246. Srivastava, A., Goldberger, H., Dimtchev, A., Ramalinga, M., Chijioke, J., Marian, C., Li, X. (2013). MicroRNA profiling in prostate cancer-the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. PloS one, 8(10), e76994. doi:10.1371/journal.pone.0076994.
247. Schaefer, A., Jung, M., Mollenkopf, H. J., Wagner, I., Stephan, C., Jentzmik, F., Jung, K. (2010). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. International journal of cancer, 126(5), 1166-1176. doi: 10.1002/ijc.24827.
248. Tucci, P., Agostini, M., Grespi, F., Markert, E. K., Terrinoni, A., Vousden, K. H., Giaccone, G. (2012). Loss of p63 and its microRNA-205 target results in enhanced cell migration and metastasis in prostate cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(38), 15312-15317. doi:10.1073/pnas.1110977109.
249. Penna, E., Orso, F., & Taverna, D. (2015). miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions. Journal of Investigative Dermatology, 135(4), 960-969. doi:10.1038/jid.2014.479.
250. Zhao, C., Sun, W., Zhang, P., Ling, S., Li, Y., Zhao, D., Wang, C. (2015). miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. RNA biology, 12(3), 343-353. doi:10.1080/15476286.2015.1017205.
251. Schwarzenbach, H., Milde-Langosch, K., Steinbach, B., Müller, V., Pantel, K. (2012). Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. Breast cancer research and treatment, 134(3), 933-941. doi:10.1007/s10549-012-1988-6.
252. Zou, Z. J., Fan, L., Wang, L., Xu, J., Zhang, R., Tian, T., Xu, W. (2015). miR-26a and miR-214 down-regulate expression of the PTEN gene in chronic lymphocytic leukemia, but not PTEN mutation or promoter methylation. Oncotarget, 6(2), 1276–1285. doi: 10.18632/oncotarget.2626

253. Yang, Z., Chen, S., Luan, X., Li, Y., Liu, M., Li, X., Tang, H. (2009). MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells. *IUBMB life*, 61(11), 1075-1082. doi: 10.1002/iub.252.
254. Deng, M., Ye, Q., Qin, Z., Zheng, Y., He, W., Tang, H., Yan, Q. (2013). miR-214 promotes tumorigenesis by targeting lactotransferrin in nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biology*, 34(3), 1793-1800. doi: 10.1007/s13277-013-0718-y.
255. Walter, B.A., Valera, V.A., Pinto., P.A., Merino, M.J., (2013). Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *J Cancer*, 4(5):350-357. doi:10.7150/jca.6394.

Додаток А

Список публікацій здобувача

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., Chepurnaty 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. Zadvornyi 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'є мужчини. - 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. Циркулюючі 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)*

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.Лукьянова, 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.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Науково-практична конференція. "Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин" (Яремче, 15-16 жовтня 2015 р.) - постерна доповідь
2. Науково-практична конференція молодих вчених "Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології" (Київ, 18 березня 2016 р.) - усна доповідь.
3. 12th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference (Štrbské Pleso, September 3-7, 2016) - постерна доповідь.
4. XIII з'їзд онкологів та радіологів України (Київ, 26-28 травня 2016 р.) - постерна доповідь.
5. International Scientific Conference "Integrated clinical and pathogenetic approaches in diagnosis and therapy of cancer" (Kyiv, June13-15, 2016) - постерна доповідь.
6. IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 15-17 июня 2016 г.) - постерна доповідь.
7. International Scientific Conference "Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy" (Kyiv, October 13-15, 2017) - постерна доповідь.
8. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances», (Київ, 24-27 квітня 2018 р.) - усна доповідь.
9. 5th European Congress of Immunology (Amsterdam, 2-5 September, 2018)
10. EFIS-EJI Tatra Immunology Conference "Molecular Determinants of T-Cell Immunity" (Štrbské Pleso, June 9 - 13, 2018) - постерна доповідь.
11. 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2018), (Yerevan, October 19 – 22, 2018) - усна доповідь.
12. 6 th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation, (Yaremche, June 18-21, 2019) - постерна доповідь.
13. XVII міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / bioscience advances»,

(Київ, 23-25 квітня 2019 р.) - усна доповідь

14. Науково-практична конференція молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, 4–5 лютого 2019 р.) - усна доповідь

15. Науково-практична конференція «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоналізованої терапії раку» (Київ, 3–4 жовтня 2019 р.) - усна доповідь