

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ІНЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**ДОВГІ НЕКОДУВАЛЬНІ РНК В ЕПІГЕНЕТИЧНІЙ РЕГУЛЯЦІЇ  
ПУХЛИНОАСОЦІЙОВАНИХ ГЕНІВ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ  
ЗАЛОЗИ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю

Біологія та біохімія

Тодоришина Данііла Павловича

Науковий керівник від кафедри

д-р біол. наук, ст. наук. співроб.

Андрійчук Т.Р.

Робота виконана у відділі молекулярної онкогенетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом наук. співр. відділу, канд. біол. наук Маньковської Оксани Сергіївни

Оцінка захисту роботи

\_\_\_\_\_

**Київ – 2026 р.**

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

|       |   |                                                                                   |
|-------|---|-----------------------------------------------------------------------------------|
| АДТ   | — | андрогендеприваційна терапія;                                                     |
| АПЗ   | — | аденома передміхурової залози;                                                    |
| днРНК | — | довга некодувальна РНК;                                                           |
| нкРНК | — | некодувальна РНК;                                                                 |
| ПСА   | — | простатоспецифічний антиген;                                                      |
| РПЗ   | — | рак передміхурової залози;                                                        |
| СрG   | — | cytosine-phosphate-guanine (цитозин-фосфогуанін);                                 |
| EDTA  | — | ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота);                |
| GSEA  | — | gene set enrichment analysis (аналіз збагачення за функціональною приналежністю). |

## ЗМІСТ

|                                                                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ВСТУП.....</b>                                                                                                      | <b>4</b>  |
| <b>РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика раку передміхурової залози та біомаркерів при раку передміхурової залози.....</b> | <b>6</b>  |
| 1.1. Загальна характеристика раку передміхурової залози.....                                                           | 6         |
| 1.2. Епігенетичні зміни при раку передміхурової залози.....                                                            | 8         |
| 1.2.1. Гіперметилування промоторів генів-онкосупресорів.....                                                           | 8         |
| 1.2.2. Довгі некодувальні РНК.....                                                                                     | 9         |
| 1.3. Загальна характеристика епігенетичних біомаркерів при раку.....                                                   | 10        |
| 1.4. ANRASSF1, PANDAR, H19 і GAS5 у раку передміхурової залози.....                                                    | 12        |
| 1.5. Аденома передміхурової залози та пов'язані епігенетичні зміни.....                                                | 16        |
| 1.6. Сеча як рідинна біопсія.....                                                                                      | 19        |
| <b>РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....</b>                                                                   | <b>21</b> |
| 2.1. Забір клінічних зразків.....                                                                                      | 21        |
| 2.2. Виділення РНК.....                                                                                                | 23        |
| 2.3. Синтез кДНК.....                                                                                                  | 24        |
| 2.4. Кількісна ПЛР у реальному часі.....                                                                               | 25        |
| 2.5. Методи статистичної обробки.....                                                                                  | 26        |
| <b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....</b>                                                             | <b>29</b> |
| 3.1. Дослідження тканинних зразків.....                                                                                | 29        |
| 3.2. Дослідження зразків сечі.....                                                                                     | 36        |
| 3.3. Дослідження ізоформ вибраних довгих некодувальних РНК.....                                                        | 46        |
| <b>ВИСНОВКИ.....</b>                                                                                                   | <b>52</b> |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>                                                                                 | <b>53</b> |
| <b>Додаток А.....</b>                                                                                                  | <b>62</b> |

## ВСТУП

Рак передміхурової залози (РПЗ) належить до аденокарцином, тобто до типу злоякісних новоутворень, що розвиваються із залозистих клітин організму. За даними Національного канцер-реєстру за 2024 рік, на неокупованій території України було зареєстровано 8668 нових випадків РПЗ і 2541 випадок смерті від цього захворювання, що становить майже третину від кількості вперше виявлених випадків. При цьому структура діагностованих стадій є вкрай несприятливою: найменше випадків виявляють на I стадії – лише 0,2%, найбільше – на II стадії, 37,2%, тоді як на IV стадії діагностують 33,4% випадків, тобто приблизно третину [1].

Одним із провідних підходів до лікування РПЗ є андрогендеприваційна терапія (АДТ), метою якої є зниження рівня тестостерону в крові до значень менше 50 нг/дл, оскільки для росту більшості таких пухлин необхідний високий рівень цього гормону. Проте в тих випадках, коли пухлина не демонструє відповіді на АДТ, ідеться про кастраційно-резистентну форму РПЗ. Водночас клінічні прояви хвороби зазвичай виникають лише на пізніх етапах її розвитку, тобто на III–IV стадіях, що істотно ускладнює раннє виявлення захворювання, хоча саме лікування на початкових стадіях РПЗ є найбільш результативним [2].

Отже, для ефективної боротьби з РПЗ принципово важливими є не лише своєчасне встановлення діагнозу, а й прогнозування подальшого перебігу захворювання. Саме тому у світі триває активний пошук біомаркерів, здатних допомогти у розв’язанні цієї проблеми. Одним із найбільш логічних напрямів такого пошуку є нуклеїнові кислоти та особливості їхньої експресії, передусім гени, безпосередньо пов’язані з розвитком раку. Однак інтерес становлять не лише самі гени та їхні транскрипти, тобто мРНК, а й системи, що регулюють їхню активність. До них належать молекули тієї самої природи – нуклеїнові кислоти, які не кодують білок, а виконують регуляторні функції.

Разом із різноманітними модифікаціями самої ДНК вони формують важливу ланку клітинної регуляції, відому як епігенетична [3].

Метою даної роботи було поглибити розуміння днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 як елементів епігенетичної регуляції пухлиноасоційованих генів за раку передміхурової залози (РПЗ) і оцінити їхній діагностичний і прогностичний потенціал для РПЗ та протипухлинної терапії.

Відповідно до мети роботи були сформульовані наступні завдання:

- 1) визначити відносний вміст днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у зразках тканин передміхурової залози пацієнтів, хворих на рак або аденому передміхурової залози, і встановити кореляції з клінічними показниками;
- 2) вивчити відносний вміст днРНК ANRASSF1, GAS5 та PANDAR у зразках сечі пацієнтів, хворих на РПЗ, та здорових донорів і встановити кореляції з клінічними показниками;
- 3) продемонструвати для днРНК ANRASSF1, PANDAR та H19 наявність чи відсутність диференціації біологічної функції на рівні окремих ізоформ.

## РОЗДІЛ 1

# ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА БІОМАРКЕРІВ ПРИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

### 1.1. Загальна характеристика раку передміхурової залози

РПЗ найчастіше діагностують у чоловіків середнього віку, переважно в межах 45–60 років. Серед усіх злоякісних новоутворень у чоловіків у країнах ЄС та США це захворювання займає перше місце за рівнем захворюваності та друге – за смертністю. В Україні, за даними Національного канцер-реєстру за 2024 рік, на неокупованих територіях було зареєстровано 8668 нових випадків РПЗ і 2541 випадок смерті від цього захворювання, тобто приблизно на кожні 10 нових випадків припадає 3 летальні. Станом на 2024 рік під наглядом перебувало 56107 пацієнтів із РПЗ, що становило 14% від загальної кількості чоловіків з онкологічними захворюваннями. Таким чином, в Україні РПЗ посідає друге місце за захворюваністю серед усіх онкопатологій у чоловіків і перше – за смертністю [1, 2].

Розвиток РПЗ пов'язаний з аномальним розростанням епітелію передміхурової залози. На початкових етапах формується локалізована пухлина, яка надалі може перейти в аденокарциному з місцевим поширенням, а згодом – у метастатичну форму раку простати. Однією з ключових біологічних характеристик РПЗ є його гормональна залежність. Це було вперше продемонстровано Хаггінсом і Ходжесом у 1941 році, коли вони показали, що кастрація супроводжується зменшенням розміру пухлини у хворих на РПЗ. Саме це спостереження стало підґрунтям для розроблення андрогендеприваційної терапії (АДТ), яка базується на використанні препаратів, що пригнічують синтез андрогенів і знижують їхній внутрішньоклітинний рівень до значень, подібних до посткастраційних. Проте з часом може розвиватися форма захворювання, нечутлива до такого

підходу, – кастраційно-резистентний РПЗ, який продовжує прогресувати навіть за умов низької концентрації андрогенів [4].

Висока смертність від РПЗ значною мірою зумовлена недостатньою ефективністю наявних терапевтичних підходів і пізнім виявленням хвороби. Це пов'язано з тим, що перші клінічні прояви часто виникають лише тоді, коли пухлина вже набуває інвазивних властивостей або формує віддалені метастази. Саме тому для виявлення РПЗ на ранніх стадіях, коли лікування є найбільш результативним, особливого значення набувають молекулярні тести. Хоча пальцеве ректальне дослідження залишається типовим діагностичним методом, центральну роль у сучасному скринінгу відіграє визначення рівня простатоспецифічного антигену (ПСА). Підвищений вміст ПСА вказує лише на ймовірність наявності РПЗ, але не дає змоги достовірно підтвердити діагноз. Так, при рівні ПСА 4-10 нг/мл ймовірність РПЗ становить близько 25%, а за значень понад 10 нг/мл – не перевищує 50%, тому сам по собі цей показник не може вважатися достатньо точним діагностичним критерієм [3].

Для клітин РПЗ характерна висока частота геномних перебудов, що супроводжуються змінами кількості копій ДНК. Особливо це властиво агресивним та прогресуючим первинним і метастатичним пухлинам, у яких виявляють численні дуплікації великих ділянок геному, інсерції, делеції, транслокації та формування гібридних генів. Додаткову складність створює гетерогенність самої передміхурової залози, яка відображається і на гетерогенності пухлин цього органа. Унаслідок цього ускладнюються як молекулярне типування РПЗ, так і ідентифікація тих молекулярно-генетичних змін, що відіграють вирішальну роль у його виникненні та розвитку [5, 6].

Гістологічне дослідження РПЗ має фундаментальне значення для оцінки ступеня розвитку пухлини та прогнозування її подальшого перебігу. Одним із найуживаніших підходів є шкала Глісона (Gleason score), за допомогою якої визначають, наскільки морфологія біопсійного зразка подібна до нормальної тканини передміхурової залози. У межах цієї системи низькі бали,

починаючи від 1, відповідають тканині з мінімальними відхиленнями від норми, тоді як високі, зокрема 5, вказують на виражену атипію пухлинних клітин і відсутність нормальних залозистих структур. Проміжні значення відображають перехід від відносно збереженої архітектури тканини до її втрати, а також наростання клітинної атипії. Шкала Глісона залишається одним із ключових способів морфологічної характеристики РПЗ [7].

## **1.2. Епігенетичні зміни при раку передміхурової залози**

Хоча механізми встановлення, підтримання та пластичності епігенетичного регулювання в нормальних і пухлинних клітинах досі вивчені не повністю, вже точно показано, що порушення епігенетичних процесів є спільною рисою майже всіх форм раку. Це підкреслює важливу роль епігенетичних механізмів у розвитку властивостей, які забезпечують пухлинним клітинам підвищену здатність до самооновлення, виживання та інвазивного росту [8, 9].

### **1.2.1. Гіперметилування промоторів генів-онкосупресорів**

Метилування ДНК є одним із найважливіших епігенетичних механізмів регуляції експресії генів, а його порушення відіграють суттєву роль у розвитку РПЗ. Для РПЗ характерне гіперметилування CpG-острівців у промоторних ділянках генів-онкосупресорів, зокрема *GSTP1*, *RASSF1A* та *APC*, що призводить до пригнічення їхньої транскрипції; при цьому такі зміни можуть виникати вже на ранніх етапах пухлинного процесу, ще до формування інвазивної карциноми, а надалі набувати більш поширеного характеру в геномі пухлинних клітин [9, 10].

### 1.2.2. Довгі некодувальні РНК

Транскриптом людини включає як кодувальні, так і некодувальні РНК. До довгих некодувальних РНК (днРНК) належать транскрипти довжиною понад 200 нуклеотидів, серед яких виділяють довгі міжгенні РНК, антисенсові РНК, псевдогенні транскрипти та кільцеві РНК. Подібно до мРНК, некодувальні РНК демонструють диференційовані профілі експресії в умовах пухлинного росту. Крім того, частину некодувальних РНК, пов'язаних із канцерогенезом, можна виявити не лише всередині клітини, а й у позаклітинних середовищах [11].

У здорових клітинах підтримання гомеостазу забезпечується збалансованою взаємодією онкогенів та онкосупресорів. Під час канцерогенезу ця рівновага порушується, що супроводжується надекспресією частини днРНК, які функціонують як онкогени, і зниженням експресії тих, що виконують онкосупресорну роль. Однією з таких днРНК є PCAT-1, яка виявляє високу активність у локалізованих і метастатичних формах РПЗ високого ступеня злоякісності. Її дія пов'язана зі стимуляцією пухлинної прогресії за рахунок посилення клітинної проліферації. Навпаки, зниження експресії PCAT-1 призводить до зменшення швидкості проліферації приблизно на 25–50%. Після нокдауну *PCAT-1* у клітинах РПЗ було виявлено 255 генів із підвищеною та 115 генів зі зниженою експресією. Серед генів, експресія яких зростала, переважали ті, що пов'язані з мітозом і регуляцією клітинного циклу, що додатково підтверджує онкогенну роль цієї днРНК [12].

Але днРНК можуть діяти і як онкосупресори. Одним із таких прикладів є днРНК H19, яка пригнічує експресію гена *TGFβ1*, що бере участь у контролі росту, поділу й диференціації клітин і характеризується надмірною експресією в злоякісних новоутвореннях. За даними досліджень, H19 та її похідна мікроРНК miR-675 експресуються у клітинах метастатичного РПЗ у дуже низькій кількості, тоді як у клітинах неметастатичного РПЗ вони експресуються більше. Підвищення експресії H19 приводить до зростання

рівня miR-675 у пухлині та супроводжується пригніченням клітинної міграції. miR-675 безпосередньо взаємодіє з 3'UTR *TGFβ1* і таким чином пригнічує його трансляцію [13].

### 1.3. Загальна характеристика епігенетичних біомаркерів при раку

Біомаркером вважають будь-яку ознаку, яку можна кількісно визначити і використати як індикатор певного біологічного стану. У цій ролі найчастіше застосовують молекулярні, цитологічні або біохімічні показники. Використання біомаркерів забезпечує динамічний і потужний підхід до вивчення широкого спектра захворювань, а також відкриває можливості для їх застосування в аналітичній епідеміології, рандомізованих клінічних дослідженнях, скринінгу, діагностиці та прогнозуванні. Вони можуть відображати різні етапи розвитку патологічного процесу – від найперших змін до термінальних стадій, а також бути корисними як для дослідження перебігу біологічних процесів у нормі, так і для оцінки ефективності різних підходів до терапії [14, 15].

У добу прецизійної медицини особливого значення набувають такі характеристики біомаркерів, як висока чутливість і специфічність, насамперед тоді, коли йдеться про виявлення ранніх стадій раку. Біомаркери з високою прогностичною цінністю є важливими не лише для скринінгу та точнішої діагностики, а й для глибшого розуміння біологічних шляхів і регуляторних механізмів, залучених до розвитку патології. Саме тому вони становлять інтерес і як потенційна основа для створення нових лікарських засобів [16].

Аномальна експресія днРНК сприяє прогресуванню злоякісних новоутворень, оскільки впливає на проліферацію, метастазування, самовідновлення, виживання та апоптоз шляхом транскрипційної або посттранскрипційної регуляції. днРНК виявляють також у крові та сечі. У

нормальних тканинах рівні експресії онкогенних днРНК є нижчими й характеризуються тканиноспецифічними патернами, тоді як у пухлинних тканинах багато з них надекспресуються. Крім того, днРНК демонструють специфічні профілі експресії залежно від стадії раку та типу тканини. Сукупність цих властивостей свідчить про перспективність їх використання як діагностичних і прогностичних маркерів, а також як потенційних терапевтичних мішеней у онкології [12, 17].

Окрему увагу серед днРНК привертають кільцеві РНК – ендогенні довгі некодуючі транскрипти, які можуть діяти як молекулярні «губки», конкурентно зв'язуючись із мікроРНК і тим самим регулюючи транскрипцію та сплайсинг. Вони здатні виконувати функцію резервуарів мікроРНК, брати участь у їх транспортуванні або перешкоджати зв'язуванню мікроРНК із цільовими генами [16, 18].

Крім цього, кільцеві РНК безпосередньо впливають на експресію генів на транскрипційному і посттранскрипційному рівнях через взаємодію з компонентами сплайсосоми та регуляцію співвідношення між канонічним і альтернативним сплайсингом. За своєю будовою це одноланцюгові РНК, позбавлені кепа і полі-А хвоста, але завдяки ковалентному з'єднанню кінців вони утворюють замкнену кільцеву структуру. Саме така конфігурація забезпечує їм вищу стабільність порівняно з іншими типами РНК. У поєднанні з тканиноспецифічною експресією це робить кільцеві РНК перспективними кандидатами на роль біомаркерів раку [16, 18].

Сучасні дослідження підтверджують можливість їх застосування як діагностичних маркерів, особливо при виділенні з позаклітинних везикул біологічних рідин. Водночас на сьогодні їхню придатність як діагностичних біомаркерів рідинної біопсії найкраще вивчено саме в зразках крові, тоді як у слині, шлунковому соку та сечі такі дослідження поки що поодинокі [16, 18].

#### 1.4. ANRASSF1, PANDAR, H19 і GAS5 у раку передміхурової залози

ANRASSF1 є антисенсовим транскриптом локусу *RASSF1* і належить до днРНК, для яких показано безпосередню участь у локальному епігенетичному контролі експресії генів. Її найбільш вивчена функція пов'язана з репресією транскрипції ізоформи *RASSF1A*, яка має онкосупресорні властивості та часто виявляється репресованою в пухлинних клітинах. Показано, що ANRASSF1 діє переважно *in cis*: вона взаємодіє з ділянкою промотора *RASSF1A* і сприяє рекрутуванню комплексу PRC2, зокрема компонента SUZ12, унаслідок чого підвищується рівень репресивної мітки H3K27me3 та зменшується транскрипція *RASSF1A*. Важливим є те, що цей ефект має локус-специфічний характер, тобто ANRASSF1 не просто асоціюється з глобальними епігенетичними змінами, а бере участь у вибіркового пригніченні конкретного онкосупресорного локусу. ANRASSF1 розглядають як днРНК, здатну підтримувати стабільний репресований стан гена, важливого для контролю проліферації та росту пухлини при РПЗ [19].

Значення ANRASSF1 підсилюється тим, що її підвищена експресія описана в пухлинних клітинних лініях, у тому числі простатичного походження, де вона поєднується зі зниженням експресії *RASSF1A*. Додатково показано, що ця днРНК залучена до регуляції співвідношення альтернативних транскриптів *RASSF1A* і *RASSF1C*, що вказує на її участь не лише в репресії одного гена, а й у більш загальній регуляції експресії локусу *RASSF1*. У контексті РПЗ це має особливий інтерес, оскільки епігенетична інактивація *RASSF1A* є добре описаною подією при канцерогенезі простати: асоціацію між метилуванням промотора *RASSF1A* та РПЗ показано в метааналізі, а епігенетично інактивованій *RASSF1A* розглядають як потенційний пухлинний біомаркер. Отже, ANRASSF1 може відображати один із РНК-опосередкованих механізмів, через які реалізується репресія *RASSF1A* в пухлинних клітинах передміхурової залози [17, 19-21].

PANDAR (promoter of CDKN1A antisense DNA damage-activated RNA) належить до добре описаних пухлиноасоційованих днРНК, експресія яких пов'язана з відповіддю клітини на ушкодження ДНК та з перебудовою програм виживання при стресі. За даними систематичного огляду, PANDAR виявляє надекспресію в різних типах злоякісних новоутворень і часто асоціюється з несприятливими клініко-патологічними характеристиками. Її дію пов'язують насамперед із тим, що вона сприяє проліферації пухлинних клітин, зменшує їхню схильність до апоптозу та підтримує інвазивний фенотип. У функціональному плані PANDAR розглядають як днРНК, що може реалізовувати свою дію через кілька механізмів одночасно, зокрема через взаємодію з транскрипційними регуляторами та через включення в осі, опосередковані мікроРНК [22].

Попри те, що молекулярна роль PANDAR саме при РПЗ поки що вивчена обмежено, наявні функціональні дослідження в інших типах пухлин дозволяють точніше окреслити спектр її можливих ефектів. Так, у клітинах раку молочної залози надекспресія PANDAR супроводжувалася зниженням Е-кадгерину і підвищенням N-кадгерину, що вказує на її зв'язок із перебудовою клітинно-адгезивних властивостей та зсувом у бік епітеліально-мезенхімного переходу. У клітинах карциноми щитоподібної залози показано, що PANDAR реалізує свій ефект через вісь miR-637/KLK4: підвищення її активності супроводжувалося посиленням проліферації, міграції та інвазивності пухлинних клітин. Таким чином, навіть за відсутності великої кількості прямих робіт для РПЗ, PANDAR доцільно розглядати як днРНК із виразним онкогенним потенціалом, здатну підтримувати ріст пухлини, інвазивність та уникнення апоптозу [22-24].

GAS5 зазвичай розглядають як онкосупресорну днРНК, рівень якої знижується в низці твердих пухлин, зокрема і при РПЗ. Для клітин РПЗ показано, що зменшення експресії GAS5 супроводжується посиленням проліферації, тоді як її надекспресія, навпаки, пригнічує клітинний ріст і затримує клітинний цикл у фазі G0/G1. Один із найбільш детально описаних

механізмів пов'язаний із віссю GAS5/E2F1/P27Kip1: GAS5 взаємодіє з транскрипційним фактором E2F1, посилює його зв'язування з промотором P27Kip1 і сприяє експресії білка, який стримує проходження клітини через контрольні точки циклу. Отже, GAS5 при РПЗ бере участь не лише в загальному пригніченні проліферації, а й у конкретному транскрипційному механізмі, що обмежує перехід до фази синтезу ДНК [25, 26].

Разом з тим дані щодо GAS5 не є повністю однорідними, що, імовірно, пов'язано з існуванням різних транскриптних варіантів цього локусу. Для одного з транскриптів, GAS5-007, показано, що його рівень зменшується під впливом андрогенів і пригнічується через андрогеновий рецептор (AR). Водночас саме для цього транскрипта продемонстровано зв'язок із посиленням проліферації клітин РПЗ, а його нокдаун супроводжувався пригніченням клітинного росту, змінами клітинного циклу та посиленням апоптозу. Ці результати вказують на те, що функціональна роль GAS5 при РПЗ може бути ізоформ-специфічною, і при інтерпретації даних експресії важливо враховувати не лише загальний рівень днРНК, а й те, який саме її варіант аналізується [25, 27].

Окремі роботи показують, що GAS5 впливає і на чутливість клітин РПЗ до терапевтичних чинників. Зокрема, продемонстровано її участь у регуляції проліферації як AR-позитивних, так і AR-негативних клітин за умов дії дексаметазону. Крім того, встановлено, що підвищення рівня GAS5 пригнічує життєздатність і міграцію пухлинних клітин, підвищує їхню радіочутливість і посилює апоптоз після опромінення через вісь miR-320a/RAB21; при цьому нокдаун *RAB21* послаблював ефекти надекспресії GAS5. Додатково показано, що GAS5 може підвищувати чутливість клітин РПЗ до терапевтичного препарату паклітакселу та одночасно пригнічувати епітеліально-мезенхімний перехід через вісь miR-18a-5p/STK4. Також продемонстровано, що відмінності рівня GAS5 можуть бути корисними для стратифікації захворювань передміхурової залози, що додатково підкреслює її прикладне значення в контексті патології простати [28-31].

H19 належить до найбільш функціонально значущих днРНК при РПЗ, однак її роль не зводиться до єдиного універсального механізму. Показано, що вісь H19/miR-675 може бути залучена до пригнічення метастатичного потенціалу через регуляцію *TGFBI*, що вказує на участь H19 у контролі інвазивних властивостей пухлинних клітин. Надалі стало очевидно, що функції H19 суттєво залежать від мікрооточення пухлини, гормонального статусу та підтипу РПЗ [13, 32, 33].

Показано, що за умов поєднаної дії естрогену та гіпоксії експресія H19 пов'язана з репресією транскрипції  $\beta 3$ - і  $\beta 4$ -інтегринів, а також Е-кадгерину, що супроводжується змінами метастатичного потенціалу клітин РПЗ. У цих умовах H19 виступає як транскрипційний репресор компонентів адгезивного апарату, а її зниження асоціюється з посиленням інвазивності. Подальші роботи тієї ж групи показали, що сайленсинг H19 у клітинах PC-3 і 22Rv1 супроводжується збільшенням експресії Е-кадгерину і  $\beta 4$ -інтегрину, підвищенням проліферації та інвазії, а також посиленням утворення метастатичних уражень у кістках, легенях і печінці. Водночас епігенетичний препарат GSK-J4 зменшував метастатичні ураження і викликав загибель клітин у органотипових зрізах пухлини, що вказує на потенційну терапевтичну значущість H19-залежного контуру [32, 34].

Ще одним важливим аспектом є прогностичне значення H19-асоційованої мережі маркерів. На біопсійному матеріалі продемонстровано, що поєднання рівнів експресії HIF-2 $\alpha$ , eNOS,  $\beta 4$ -інтегрину, CDH1 і H19 дозволяє сформувати композитний BioScore, який дає змогу виділяти пацієнтів із вищим ризиком прогресування РПЗ. У цій моделі з несприятливим перебігом асоціювалося поєднання підвищених рівнів HIF-2 $\alpha$ , eNOS,  $\beta 4$ -інтегрину і CDH1 зі зниженим рівнем H19. Таким чином, H19 виявляється важливою складовою не лише функціональних механізмів пухлинної інвазії, а й прогностичних моделей для РПЗ [35].

Окремий напрямок досліджень стосується внеску H19 у пластичність пухлинних клітин і перехід до кастраційно-резистентного фенотипу. Для

цього типу РПЗ показано, що експресія найповніше представленої ізоформи H19 підвищена, тоді як її нокдаун зміщує клітини до більш люмінального фенотипу і підвищує їхню чутливість до АДТ. У нормі андрогени через андрогеновий рецептор репресують H19, а за дефіциту андрогенів зростає рівень SOX2, який активує транскрипцію H19. Крім того, H19 зв'язується з PRC2/EZH2, модулює H3K27me3 і H3K4me3, що супроводжується змінами профілю метилювання ДНК, тобто бере участь в епігенетичному ремоделюванні, що підтримує терапевтичну резистентність [33].

Поряд із цим H19 може діяти і через ceRNA-(конкуруючі ендегенні РНК)-подібні механізми. Показано, що протипухлинний ефект Brevilin A у клітинах РПЗ реалізується, зокрема, через вісь H19/miR-194/E2F3, що супроводжується пригніченням проліферації, міграції та інвазії пухлинних клітин. Окремо встановлено, що H19 виявляється не лише в клітинах РПЗ, а й у секретованих екзосомах, а її рівень змінюється у відповідь на стимуляцію андрогенами або блокаду андрогенового рецептора. Це додатково підтверджує зв'язок H19 з андроген-залежною регуляцією і підкреслює багаторівневий характер її участі в біології РПЗ [36, 37].

### **1.5. Аденома передміхурової залози та пов'язані епігенетичні зміни**

Аденома передміхурової залози (АПЗ), або доброякісна гіперплазія передміхурової залози, є поширеним доброякісним проліферативним станом, який формується на тлі комплексної взаємодії гормональних, запальних, метаболічних і тканинно-ремоделювальних механізмів. Сучасні уявлення про цю патологію виходять за межі суто вікових або анатомічних змін, оскільки в тканині аденоми виявляють активну стромальну та епітеліальну перебудову, ознаки хронічного запалення, зміни міжклітинної комунікації, посилення оксидативного стресу та залучення сигнальних шляхів, пов'язаних з TGF- $\beta$ , AMPK, mTOR та молекулами клітинної адгезії. Усе це свідчить про те, що

АПЗ не є молекулярно «нейтральним» фоном, а відображає окремий варіант патологічного стану тканини простати, який доцільно використовувати як групу порівняння при аналізі змін, характерних для РПЗ. Саме зіставлення злоякісної та доброякісно зміненої тканини може точніше оцінити, які молекулярні особливості пов'язані із власне пухлинною трансформацією, а які можуть бути спільними для проліферативних процесів у передміхуровій залозі загалом [38-41].

Для РПЗ днРНК уже розглядають як важливих учасників злоякісного процесу, однак для частини з них лишається відкритим питання, чи спостерігаються подібні зміни також у доброякісно гіперплазованій тканині, чи вони є більш специфічними саме для раку. Тому аналіз експресії H19, GAS5, PANDAR та ANRASSF1 в АПЗ є виправданим насамперед як підхід до коректнішого зіставлення доброякісного та злоякісного станів простати. Для окремих з цих днРНК уже існують прямі дані в межах патології простати, тоді як для інших поки доступні лише непрямі відомості, отримані при вивченні аденом інших органів [31, 42-44].

Для H19 наявні найбільш безпосередні підстави використовувати її в такому порівнянні. У дослідженні, де аналізували тканини РПЗ і АПЗ, було показано, що рівень H19 у зразках АПЗ є нижчим, ніж у тканині РПЗ. У тій самій роботі пригнічення H19 у клітинних моделях простати супроводжувалося зниженням проліферації та змінами показників гліколітичного метаболізму. Такі результати не дають змоги стверджувати, що H19 є визначальним фактором патогенезу аденоми, однак вони чітко вказують, що ця днРНК залучена до молекулярних відмінностей між доброякісним і злоякісним станами тканини простати [42].

Додатковим аргументом на користь доцільності аналізу H19 є те, що її участь описана і в інших аденоматозних процесах. Зокрема, в аденомах гіпофіза H19 пов'язували з ростом пухлини, інвазивністю та чутливістю до терапії. Такі результати не можна прямо переносити на передміхурову залозу,

однак вони показують, що H19 є функціонально значущою не лише в карциномах, а й у аденоматозних процесах [45-47].

Для GAS5 підґрунтя для включення до такого аналізу також є досить переконливим. У сучасному дослідженні, присвяченому молекулярній стратифікації захворювань простати, показано, що рівень GAS5 є нижчим при передракових ураженнях і РПЗ порівняно з АПЗ. Це означає, що АПЗ вже використовувалася як клінічно релевантний фон для порівняння, і GAS5 продемонструвала здатність відображати відмінності між цими станами [31].

Крім того, для GAS5 існують непрямі, але біологічно змістовні дані з інших типів аденом. У пухлинах нейроендокринного походження гіпофіза показано, що підвищення експресії GAS5 супроводжується пригніченням проліферації та посиленням апоптозу, тобто ця днРНК демонструє властивості негативного регулятора росту. Хоча такі результати були отримані не в тканині простати, вони узгоджуються з уявленням про GAS5 як про сполуку, що бере участь у контролі проліферативної активності [31, 48].

Щодо PANDAR, прямих відомостей саме для АПЗ наразі недостатньо. Водночас у свіжому дослідженні аденом гіпофіза встановлено, що рівень експресії PANDAR в аденомах був вищим, ніж у парних непухлинних тканинах. Цей факт сам по собі ще не дозволяє робити висновки про характер експресії PANDAR у АПЗ, однак свідчить, що ця днРНК може бути залученою до аденоматозних процесів як таких [43].

Схожа ситуація спостерігається і для ANRASSF1. Для АПЗ прямих даних щодо цієї днРНК майже немає, однак певне підґрунтя для її аналізу все ж існує. У новій роботі на аденомах щитоподібних залоз показано, що метилювання промотора RASSF1A є частою ознакою аденоматозного процесу, а рівень ANRASSF1A розглядався як один із можливих елементів цієї епігенетичної осі. Автори не підтвердили регуляторну роль ANRASSF1 у цій конкретній моделі, однак сам факт її аналізу в контексті доброякісної аденоми та епігенетичної репресії онкосупресорного гена є важливим [44].

## 1.6. Сеча як рідинна біопсія

Рідинна біопсія є неінвазивним підходом, що дає змогу аналізувати пухлиноасоційовані біомаркери в різних рідинах організму, зокрема в крові, сечі, слині, спинномозковій рідині, мокротинні та бронхоальвеолярних змивах [49, 50].

Дослідження епігенетичних біомаркерів у рідинних біопсіях розглядають як перспективний напрям сучасної онкології, оскільки такі зразки дозволяють неінвазивно оцінювати молекулярні зміни, пов'язані зі скринінгом, діагностикою, стратифікацією пухлин і моніторингом перебігу захворювання. Порівняно з твердими біопсіями, рідинні біопсії придатні для повторного відбору матеріалу та можуть краще відображати гетерогенність пухлини [49, 51].

Зразки рідинної біопсії зазвичай містять позаклітинну ДНК, різні типи РНК, циркулюючі пухлинні клітини та позаклітинні везикули, зокрема екзосоми. Особливий інтерес становлять кільцеві РНК, оскільки завдяки своїй кільцевій структурі вони є стійкішими до дії РНКаз і можуть зберігатися у рідинах організму у придатному для аналізу стані [49-51].

Сеча є одним із найбільш зручних матеріалів для рідинної біопсії, оскільки її забір є простим, малоінвазивним і придатним для повторних досліджень. Це робить сечу перспективною для динамічного спостереження за перебігом пухлинного процесу. Додатковою перевагою є те, що сеча може відображати загальні молекулярні зміни в пухлині, а не лише локальні особливості окремої ділянки тканини [52].

Разом з тим аналіз сечі має і певні обмеження. Сеча є динамічною біологічною рідиною, склад якої залежить від стану гідратації, функції нирок, об'єму виділеної сечі та впливу лікарських засобів, тому такі зразки потребують стандартизації як на етапі забору, так і під час подальшої лабораторної обробки. Попри це, у безклітинній фракції сечі можна визначати різні типи РНК, зокрема мРНК, днРНК і мікроРНК, що робить її

цінним джерелом молекулярної інформації при онкологічних дослідженнях, особливо для пухлин сечостатевої системи [52, 53].

Отже, РПЗ залишається однією з найактуальніших проблем сучасної онкології, що зумовлює потребу в поглибленому вивченні молекулярних механізмів його розвитку та пошуку інформативних показників, пов'язаних зі злоякісною трансформацією тканини простати. Узагальнення літературних даних свідчить, що днРНК H19, GAS5, PANDAR та ANRASSF1 беруть участь у процесах, які мають принципове значення для пухлинної прогресії, зокрема в регуляції проліферації, апоптозу, клітинної пластичності та епігенетичних змін. Для H19 і GAS5 уже показано зв'язок із патологією простати та відмінності між доброякісними і злоякісними станами, тоді як для PANDAR і ANRASSF1 прямих даних щодо тканини передміхурової залози наразі менше, однак наявні результати вказують на їхню потенційну залученість до проліферативних та епігенетично опосередкованих змін. У зв'язку з цим дослідження експресії зазначених чотирьох днРНК у тканинах РПЗ та АПЗ є доцільним для зіставлення молекулярних особливостей злоякісного і доброякісного процесів та для уточнення ролі цих молекул у патології простати. А дослідження їх відносного рівня у сечі пацієнтів з РПЗ та здорових донорів може привести до виявлення нових діагностичних чи прогностичних біомаркерів РПЗ.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Забір клінічних зразків

Матеріалом для дослідження були зразки тканин передміхурової залози, отримані під час хірургічного лікування пацієнтів. Зразки тканини РПЗ та відповідної парної умовно-нормальної тканини відбирали після хірургічного видалення пухлини, яке проводили в Національному інституті раку МОЗ України (Київ, Україна). Використання парних зразків умовно-нормальної тканини є важливим для зменшення впливу міжіндивідуальної варіабельності на результати аналізу. Одразу після вилучення тканинні зразки заморожували в рідкому азоті. Зразки сечі збирали в контейнери і до обробки зберігали за  $+2-8^{\circ}\text{C}$ . Під час обробки зразки сечі центрифугували за 1500g при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом 15 хв для видалення клітин. Безклітинний надосад збирали та зберігали за  $-80^{\circ}\text{C}$  до подальшого використання.

Усі клінічні зразки були отримані з дотриманням етичних норм, прийнятих для біомедичних досліджень. Забір матеріалу проводили відповідно до принципів Гельсінської декларації та згідно з рекомендаціями і дозволами, наданими Етичним комітетом Інституту урології НАМН України, Національним інститутом раку МОЗ України та Етичним комітетом Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Такий підхід забезпечував не лише правомірність використання клінічного матеріалу, а й належну етичну стандартизацію всіх етапів дослідження.

У межах даної роботи було проаналізовано 22 зразки пухлинної тканини та відповідні їм парні умовно-нормальні тканини, отримані від пацієнтів із РПЗ. Для 19 з них включено у роботу зразки сечі від тих самих пацієнтів, а також включено 11 зразків сечі від здорових донорів. Крім того, до дослідження було включено 17 зразків тканин, отриманих від пацієнтів з

аденомою передміхурової залози. Залучення до дослідження не лише пухлинної та парної умовно-нормальної тканини, а й тканин аденоми передміхурової залози дозволяло проводити ширше порівняння між злоякісними і доброякісними патологічними змінами в тканині простати. Клініко-патологічні характеристики зразків тканин РПЗ наведено в Додатку А (табл. А1).

Для подальшого аналізу всі зразки були додатково розподілені на підгрупи за двома основними клінічними характеристиками: наявністю або відсутністю гормональної терапії в анамнезі пацієнта та групою ризику РПЗ у пацієнта, від якого був отриманий зразок. Такий поділ був необхідний для того, щоб оцінити, чи пов'язані зміни експресії досліджуваних молекул не лише з самим фактом наявності пухлини, а й з окремими клінічними особливостями перебігу захворювання.

До групи низького ризику відносили випадки, за яких пухлина була обмежена межами передміхурової залози, рівень простатоспецифічного антигену (ПСА) становив менше 10 нг/мл, а ступінь злоякісності відповідав першому ступеню, тобто Gleason score до 6. Окремо виділяють також підгрупу пухлин дуже низького ризику, для яких характерний особливо повільний ріст. У таких випадках менш ніж у трьох зразках біопсійної тканини виявляють ракові клітини, а сама пухлина не визначається при пальцевому ректальному дослідженні. Виділення цієї категорії є важливим, оскільки вона відображає варіанти РПЗ з найбільш сприятливим клінічним перебігом.

До групи середнього ризику відносили пухлини, які також залишалися обмеженими передміхуровою залозою, але характеризувалися рівнем ПСА в межах від 10 до 20 нг/мл або ступенем злоякісності 2 чи 3, тобто Gleason score 7. Ця категорія є клінічно неоднорідною, тому її нерідко додатково поділяють на сприятливий та несприятливий середній ризик. Такий підхід дозволяє точніше оцінювати прогноз і краще інтерпретувати можливі молекулярні відмінності між окремими підгрупами пацієнтів.

До групи високого ризику належали випадки, у яких пухлина поширювалася за межі передміхурової залози, рівень ПСА перевищував 20 нг/мл або ступінь злоякісності відповідав 4 чи 5, тобто Gleason score від 8 до 10. Також виділяють підгрупу дуже високого ризику, до якої відносять більш агресивні пухлини. Для таких випадків характерне поширення пухлинного процесу на сім'яні пухирці (T3b) або на пряму кишку чи сечовий міхур (T4). Включення такого поділу до дизайну дослідження було важливим для того, щоб надалі аналізувати результати з урахуванням клінічної агресивності пухлинного процесу.

## **2.2. Виділення РНК**

Виділення РНК із досліджуваних тканинних зразків проводили за протоколом виробника основного реагенту, використаного для екстракції, – TRIzol Reagent. Для цього брали 30–50 мг тканини, яку гомогенізували за допомогою керамічної ступки в рідкому азоті до стану дрібного порошку, після чого переносили в пробірки, що містили 1 мл тризолу. Пробірки залишали на 5 хвилин для забезпечення повної дисоціації нуклеопротеїнових комплексів.

Потім до кожної пробірки додавали 200 мкл хлороформу, щільно закривали їх, інкубували 3 хвилини та центрифугували 15 хв при 12000 g за температури 4°C. Після центрифугування вміст пробірки розділявся на три фази: верхню водну фазу, інтерфазу та нижню червону фенол-хлороформну фазу.

Верхню водну фазу, яка містила РНК, обережно переносили в нові пробірки. До неї додавали 750–1000 мкл ізопропанолу. Отримані зразки ретельно перемішували та залишали при температурі -20°C на 12 год для осадження РНК.

Наступного дня пробірки центрифугували, після чого осад РНК відділяли від надосаду. Надосад акуратно видаляли, а осад двічі промивали 75% етиловим спиртом. Після промивання РНК підсушували за кімнатної температури, а потім розчиняли у воді, вільній від нуклеаз.

Загальну концентрацію виділеної РНК визначали спектрофотометричним методом за допомогою приладу NanoDrop Tech Experimental Technologies Inc. (США).

### 2.3. Синтез кДНК

Синтез кДНК на матриці виділеної РНК проводили з використанням набору FIREScript RT cDNA Synthesis MIX with Oligo (dT) and Random primers (Solis Biodyne, Естонія) відповідно до рекомендацій виробника.

Перед постановкою реакції концентрацію РНК у всіх зразках попередньо визначали та доводили до робочого значення 1 мкг/мкл. Це забезпечувало уніфіковані умови проведення реакції синтезу кДНК для всіх досліджуваних зразків.

До кожної мікропробірки вносили 1,5 мкл FIREScript Enzyme Mix, 2 мкл 10× RT Reaction Premix with Oligo (dT) and Random primers, 6,5 мкл води, вільної від нуклеаз, та 10 мкл зразка РНК. Для зручності виконання реакції перші три компоненти попередньо об'єднували в загальну майстер-суміш, яку потім розподіляли по мікропробірках у кількості 10 мкл на кожну.

Після внесення всіх компонентів вміст мікропробірок ретельно перемішували, короткочасно осаджували мікроцентрифугою на дно та інкубували за таким температурним режимом: 25°C – 10 хв як підготовчий етап, 50°C – 60 хв як етап роботи ревертази за оптимальної температури, 85°C – 5 хв для інгібування активності ревертази під дією високої температури, після чого зразки охолоджували до 4°C для подальшого зберігання за потреби.

Перед подальшим використанням отриману реакційну суміш розводили у 180 мкл води, вільної від нуклеаз, відповідно до кінцевого об'єму 200 мкл. Це виконували для уникнення надто високої концентрації кДНК у ПЛР-реакції, а також для зниження концентрації окремих компонентів набору, які могли негативно впливати на перебіг ПЛР. У такому вигляді кДНК за потреби могла зберігатися при температурі 4°C протягом одного року.

## 2.4. Кількісна ПЛР у реальному часі

Рівні експресії досліджуваних генів визначали методом кількісної ПЛР у реальному часі з використанням HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Естонія) на приладі CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad, США).

Ампліфікацію проводили за таким температурним режимом: початковий етап денатурації при 95°C протягом 12 хвилин, після чого виконували 40 циклів, кожен з яких включав 95°C – 15 с, 60°C – 20 с та 72°C – 20 с. Як референсні гени для нормалізації результатів використовували *ACTB* та *мяРНК U6*. Для підрахунку рівнів експресії застосовували методи  $2^{-\Delta CT}$  і  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , описані у [54]. Послідовності праймерів, використаних для проведення кількісної ПЛР у реальному часі, наведено в табл. 2.1.

Для проведення кількісної ПЛР у реальному часі для кожного зразка готували реакційні суміші загальним об'ємом 20 мкл. До складу однієї реакційної суміші входили: 4 мкл HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus, 0,5 мкл прямого праймера з концентрацією 10 мкМ, 0,5 мкл зворотного праймера, 11 мкл води, вільної від нуклеаз, та 4 мкл зразка ДНК. Усі компоненти суміші вносили в мікропробірки в зазначених об'ємах, після чого вміст ретельно перемішували та осаджували короткочасним центрифугуванням для подальшого проведення реакції.

Таблиця 2.1

**Послідовності праймерів, що використовувалися для кількісної ПЛР у  
реальному часі**

|               |                                          |
|---------------|------------------------------------------|
| ANRASSF1 [55] | Прямий 5' CGCGCAGAATTAGCCTCTCT 3'        |
|               | Зворотний 5' ACCCACTGAGATAGGTCGGG 3'     |
| PANDAR [56]   | Прямий 5' CTGTTAAGGTGGTGGCATTG 3'        |
|               | Зворотний 5' GGAGGCTCATACTGGCTGAT 3'     |
| H19           | Прямий 5' TGCTGCACTTTACAACAAC 3'         |
|               | Зворотний 5' ATGGTGTCTTTGATGTTGGGC 3'    |
| GAS5 [57]     | Прямий 5' TGGTTCTGCTCCTGGTAACG 3'        |
|               | Зворотний 5' AGGATAACAGGTCTGCCTGC 3'     |
| <i>ACTB</i>   | Прямий 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'        |
|               | Зворотний 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'     |
| U6 [58]       | Прямий 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'   |
|               | Зворотний 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3' |

## 2.5. Методи статистичної обробки

Для статистичної обробки отриманих результатів використовували набір методів, підібраних відповідно до типу досліджуваних вибірок і характеру порівнянь. На першому етапі для перевірки даних на нормальність розподілу застосовували критерій Пірсона. Після цього, залежно від типу вибірок, використовували непараметричні методи аналізу. Для порівняння парних зразків, а саме пар пухлина / умовно-нормальна тканина, застосовували тест Вілкоксона для попарних порівнянь. Для аналізу незалежних вибірок використовували тест Манна–Вітні. Окрім цього, для виявлення можливих

кореляційних зв'язків між досліджуваними показниками застосовували тест рангової кореляції Спірмена. Під час оцінки статистичної значущості використовували точні р-значення для тестів Манна–Вітні та Вілкоксона, що дозволяло коректно відзначати наявність достовірних відмінностей між досліджуваними групами.

Значення, які суттєво відрізнялися від основного масиву даних, тобто надзвичайно високі або надзвичайно низькі показники, не виключали з аналізу, оскільки їх наявність не розглядали як наслідок технічної помилки. Усі такі результати були збережені в дослідженні та враховані під час подальшої статистичної обробки. Для виконання зазначених статистичних тестів, а також для побудови графіків і візуалізації результатів використовували програми Microsoft Excel та GraphPad Prism.

Для додаткової функціональної інтерпретації результатів проводили аналіз збагачення за функціональною приналежністю (Gene set enrichment analysis, GSEA) для досліджуваних днРНК H19, PANDAR та ANRASSF1 на когорті PRAD, що відповідає вибірці РПЗ. Аналіз здійснювали за допомогою пакета LncGSEA для мови програмування R. На підготовчому етапі список генів у когорті PRAD ранжували відповідно до коефіцієнтів кореляції Пірсона, що використовували як основу для подальшого аналізу функціональних асоціацій досліджуваних днРНК.

На початковому етапі роботи із пакетом LncGSEA завантажували необхідні програмні пакети, зокрема fgsea, data.table, dplyr, tidyr, ggplot2 та LncGSEA. Дані експресії досліджуваних днРНК у зразках раку отримували з публічних баз даних mitranscriptome beta та RefLnc. Дані експресії генів у форматі матриці FPKM для когорти PRAD були отримані з бази The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Підготовку даних до аналізу проводили за допомогою функції `pre_gsea`, яка формувала таблицю експресії для подальшого аналізу. У цій таблиці перший стовпець містив назву когортного дослідження, другий – ідентифікатор транскрипту досліджуваної днРНК без номера версії, а в

наступних стовпцях були представлені рівні експресії генів, що перевищували заданий поріг, а саме середнє значення FPKM  $> 1$ . Такий підхід дозволяв відібрати для аналізу лише ті гени, експресія яких була достатньою для подальшої інтерпретації.

Після підготовки таблиці проводили власне Gene Set Enrichment Analysis за допомогою функції `lnc_gsea`. Як метрику для ранжування використовували коефіцієнт кореляції Пірсона, а як набір генів – колекцію HALLMARK з бази Molecular Signatures Database (MSigDB). Результати аналізу представляли у вигляді переліку збагачених шляхів, впорядкованих за значенням нормалізованого коефіцієнта збагачення (NES), що дозволяло оцінити функціональні асоціації досліджуваних днРНК у контексті РПЗ.

Для візуалізації результатів використовували функцію `plot_gsea`, яка давала змогу будувати графіки збагачення для окремих сигнальних шляхів, асоційованих із досліджуваними днРНК H19, PANDAR та ANRASSF1. Крім того, для порівняння результатів збагачення між різними досліджуваними днРНК застосовували функцію `pre_multiCompare`, яка формувала таблицю даних для подальшої візуалізації за допомогою `plot_multiCompare`. Це дозволяло оцінити відмінності у функціональних асоціаціях між H19, PANDAR та ANRASSF1 у контексті когорти PRAD.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

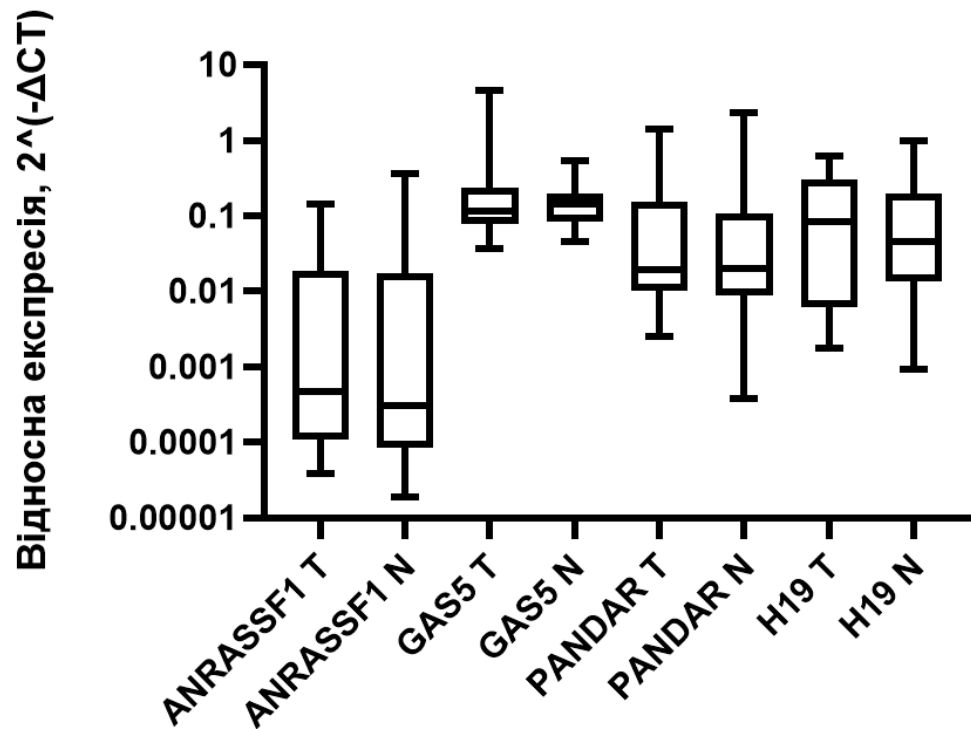
#### 3.1. Дослідження тканинних зразків

Ми охарактеризували 22 парних зразки пухлини й умовно-нормальної тканини, отримані після хірургічної резекції у пацієнтів з РПЗ, за відносною експресією днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19, визначеною як співвідношення кількості транскриптів відповідної днРНК до кількості транскриптів АСТВ та U6.

Перед проведенням порівняльного аналізу отримані дані було перевірено на нормальність розподілу. Оскільки для досліджуваних вибірок не було показано нормального розподілу, для порівняння парних зразків пухлина / умовно-нормальна тканина застосували тест Вілкоксона.

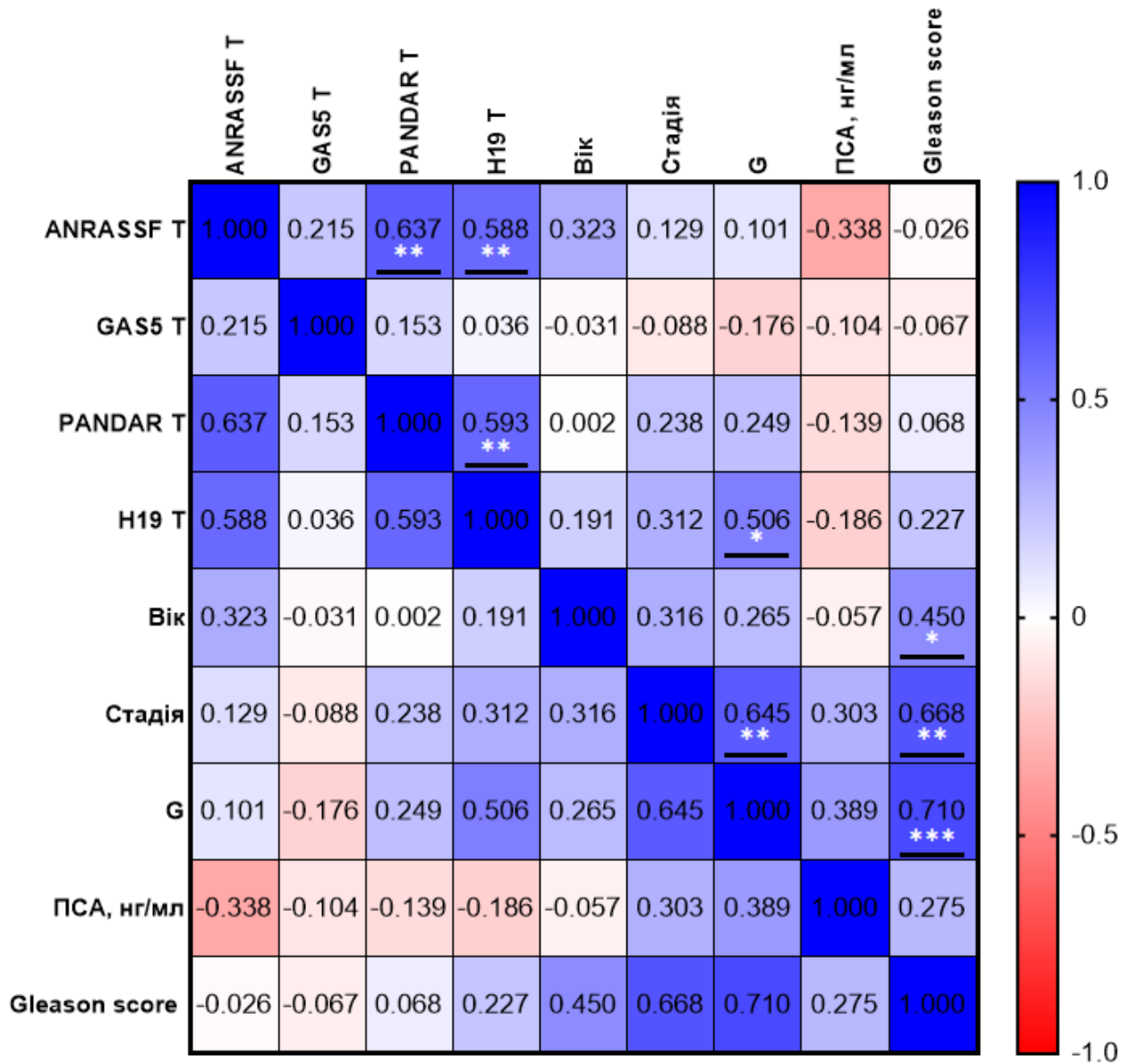
Результати аналізу наведено на рис. 3.1. Для жодної з досліджуваних днРНК не виявлено статистично значущих відмінностей між пухлинними та парними умовно-нормальними тканинами (ANRASSF1:  $p > 0,9999$ ; GAS5:  $p = 0,7745$ ; PANDAR:  $p = 0,9240$ ; H19:  $p = 0,7990$ ).

Для досліджуваних днРНК у літературі описано зв'язок із патологією РПЗ [13, 19-22, 26-37], однак у межах нашої вибірки парних тканин цей зв'язок не було підтверджено. Це не заперечує можливої ролі ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у розвитку РПЗ, але вказує, що порівняння саме парних пухлинних і прилеглих умовно-нормальних тканин може бути недостатньо контрастним для виявлення таких відмінностей. Також імовірно, що це пов'язано з тим, що прилегла умовно-нормальна тканина перебуває у спільному локальному мікрооточенні з пухлиною і може зазнавати її впливу, зокрема через міжклітинну комунікацію та перенесення регуляторних РНК позаклітинними везикулами, що потенційно зменшує вираженість відмінностей між цими двома типами зразків.



**Рис. 3.1.** Відносна експресія днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у пухлинних (T) і парних умовно-нормальних (N) тканинах передміхурової залози пацієнтів з РПЗ,  $M \pm SD$

Ми також проаналізували наявність кореляцій між відносними рівнями експресії днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у пухлинних тканинах і клініко-патологічними характеристиками. Для цього використовували тест рангової кореляції Спірмена. Результати аналізу наведено на рис. 3.2. Було виявлено статистично значущі позитивні кореляції між відносними рівнями експресії ANRASSF1 і PANDAR ( $p = 0,0014$ ), ANRASSF1 і H19 ( $p = 0,0040$ ), а також PANDAR і H19 ( $p = 0,0040$ ). Крім того, встановлено статистично значущу позитивну кореляцію між рівнем експресії H19 у пухлинній тканині та ступенем злоякісності G ( $p = 0,016$ ). Серед клініко-патологічних показників статистично значущі позитивні кореляції виявлено між віком пацієнтів і Gleason score, між стадією захворювання і показником G, між стадією і Gleason score, а також між G і Gleason score.

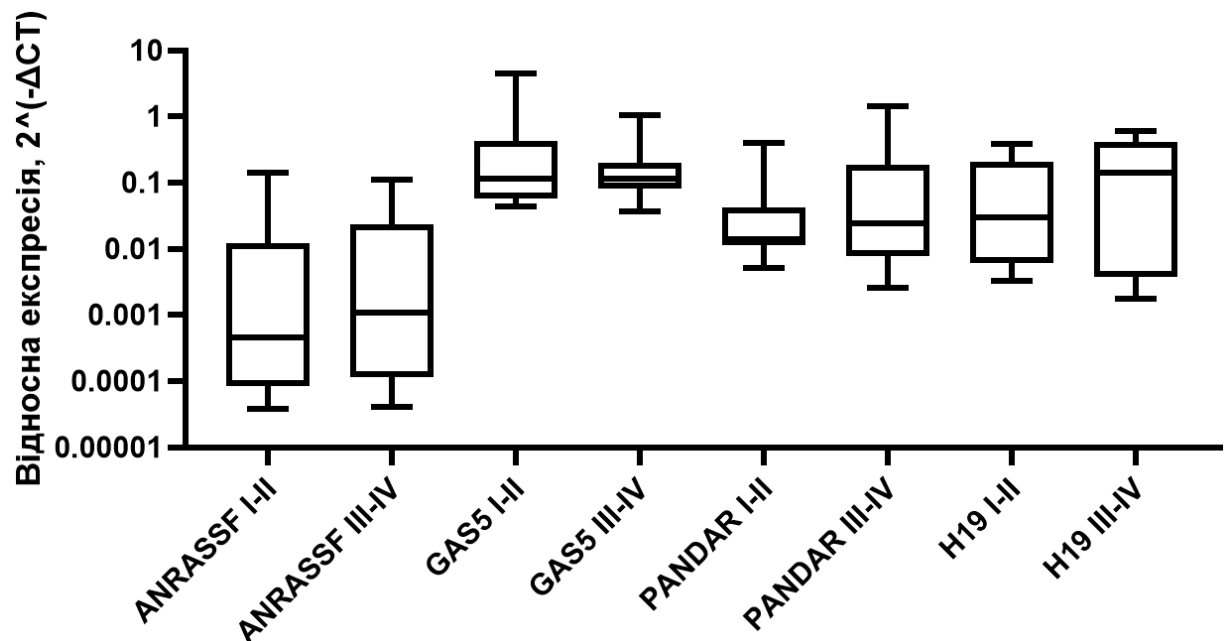


**Рис. 3.2.** Матриця кореляцій відносних рівнів експресії днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у пухлинних тканинах передміхурової залози з клініко-патологічними характеристиками пацієнтів, хворих на РПЗ  
 \* – кореляція статистично-значуща за  $p \leq 0,05$ ; \*\* – кореляція статистично-значуща за  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* – кореляція статистично-значуща за  $p \leq 0,001$

Отримані результати свідчать про наявність узгоджених змін експресії між ANRASSF1, PANDAR та H19 у пухлинних тканинах РПЗ. Зокрема, одночасний зв'язок ANRASSF1 з PANDAR і H19, а також кореляція між PANDAR та H19 можуть вказувати на те, що зміни експресії цих днРНК у пухлинній тканині відбуваються узгоджено, пов'язані певним механізмом.

Окремий інтерес становить позитивна кореляція H19 зі ступенем злоякісності G, оскільки вона узгоджується з можливим зв'язком цієї днРНК із більш вираженими ознаками пухлинної прогресії. Виявлені кореляції між стадією, ступенем злоякісності G та Gleason score є очікуваними, оскільки ці показники відображають пов'язані між собою характеристики поширеності та агресивності пухлинного процесу. Загалом отримані дані показують, що найбільш виразні зв'язки в межах дослідженої вибірки стосуються ANRASSF1, PANDAR та H19, тоді як для GAS5 статистично значущих кореляцій ні з іншими днРНК, ні з клініко-патологічними показниками виявлено не було.

Серед тканинних зразків пухлин пацієнтів з РПЗ 11 увійшло у вибірку таких, що мають РПЗ I–II стадії, і 11 – у вибірку таких, що мають РПЗ III–IV стадії. Різниця у відносній експресії досліджуваних днРНК між цими вибірками зображена на рис. 3.3.

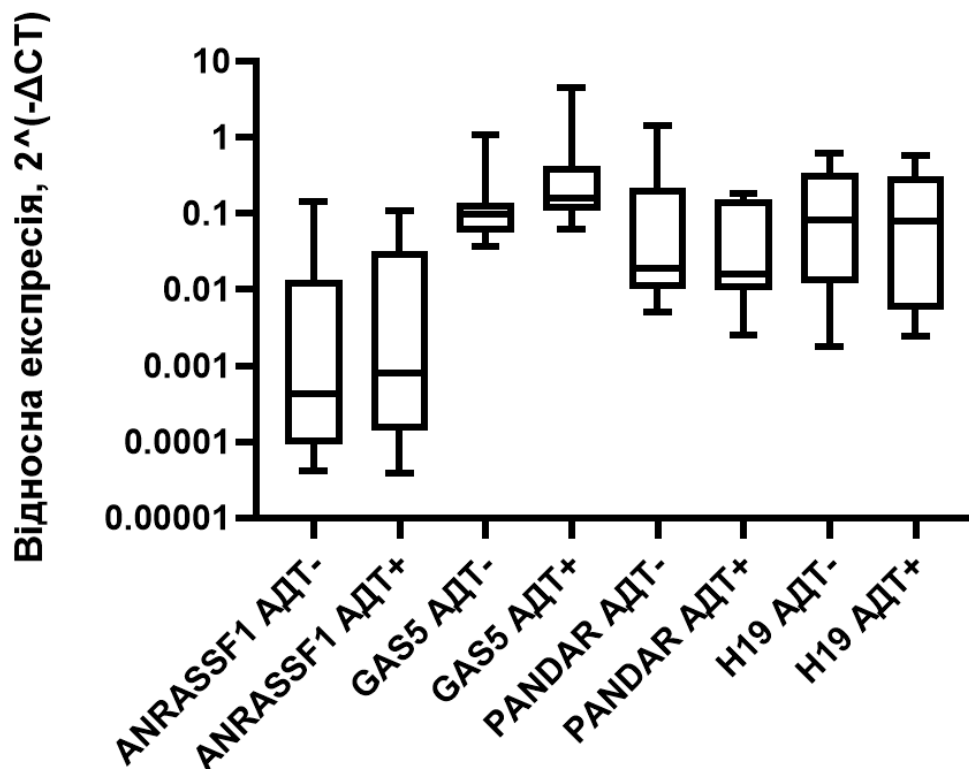


**Рис. 3.3.** Відносна експресія днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у пухлинних тканинах передміхурової залози пацієнтів з РПЗ I–II та III–IV стадій,  $M \pm SD$

Статистично значущих відмінностей у відносній експресії ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 між пухлинними тканинами пацієнтів з РПЗ I–II і III–IV стадій виявлено не було.

Для окремих досліджуваних днРНК у літературі описано зв'язок із прогресуванням РПЗ або з клініко-патологічними характеристиками пухлини [13, 22, 31, 33, 35], однак у межах нашої вибірки ми не змогли цього підтвердити. Можливо, відмінності їх експресії не обов'язково виявляються при поділі пацієнтів лише за стадією захворювання.

Серед тканинних зразків пухлин пацієнтів з РПЗ 12 увійшло у вибірку таких, які не проходили гормональну терапію, і 10 – у вибірку тих, які її проходили. Результати порівняння цих двох груп за відносною експресією днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 наведено на рис. 3.4.



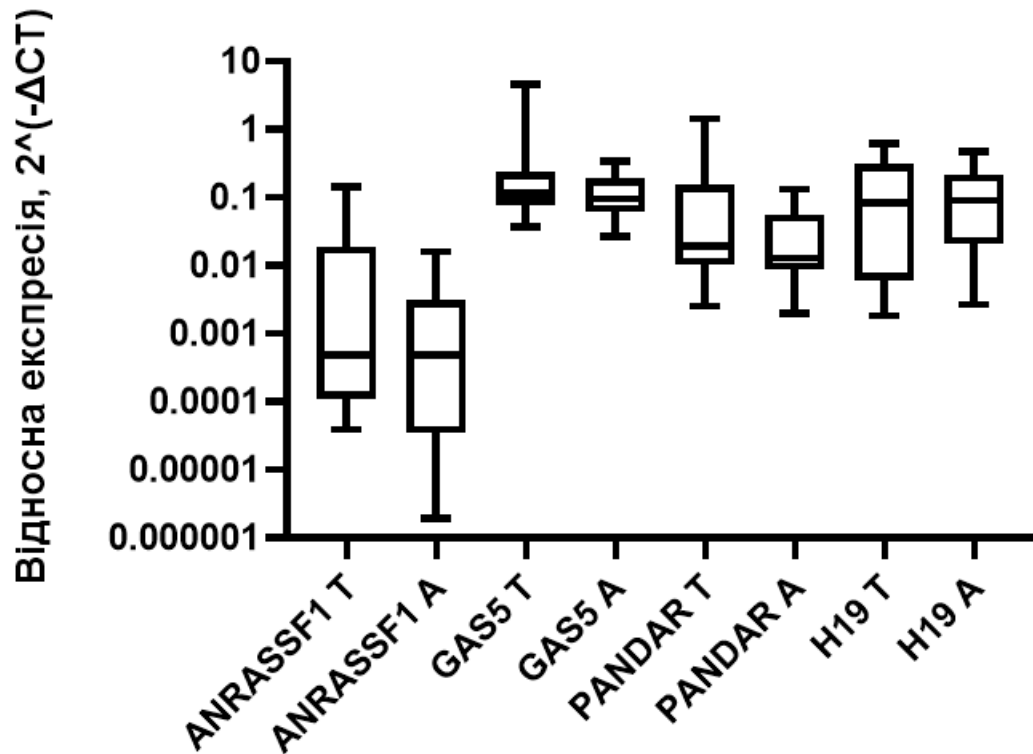
**Рис. 3.4.** Відносна експресія днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у пухлинних тканинах передміхурової залози пацієнтів, які не проходили гормональну терапію (АДТ-), і пацієнтів, які її проходили (АДТ+),  $M \pm SD$

Статистично значущих відмінностей між пухлинними тканинами пацієнтів із наявністю та відсутністю гормональної терапії для жодної з досліджуваних днРНК не виявлено. Отже, досліджені днРНК мають низький потенціал використання як прогностичні біомаркери відповіді на АДТ.

Для порівняння експресії досліджуваних днРНК у злоякісному та доброякісному процесах передміхурової залози ми проаналізували 22 зразки пухлинних тканин пацієнтів з РПЗ і 17 зразків тканин аденоми передміхурової залози. Оскільки ці вибірки не були пов'язаними (отримані від різних пацієнтів), для їх порівняння застосували тест Манна-Вітні. Результати аналізу наведено на рис. 3.5. Для жодної з досліджуваних днРНК статистично значущих відмінностей між пухлинними тканинами РПЗ і тканинами АПЗ не виявлено.

У огляді літератури ми відзначали, що найбільш перспективними днРНК для такого порівняння були насамперед H19 і GAS5, оскільки для них уже описано відмінності між доброякісними та злоякісними станами простати [31, 42]. Тому можна було очікувати, що саме ці дві днРНК у нашому дослідженні продемонструють більш виразні відмінності між РПЗ і АПЗ. Проте в межах дослідженої вибірки цього не відбулося: статистично значущого розмежування між пухлинною тканиною і тканиною аденоми для них не встановлено.

Водночас для ANRASSF1 і PANDAR така відсутність статистично значущих відмінностей виглядає менш неочікуваною. У літературі, зазначеній у огляді, для цих двох днРНК прямі дані саме щодо тканини передміхурової залози були значно обмеженішими [19, 22, 43, 44], а обґрунтування доцільності їх дослідження в АПЗ спиралося переважно на їхню функціональну значущість або на результати, отримані для інших типів аденом і пухлин. Результати не суперечать загальній логіці огляду літератури, але для цих днРНК порівняння тканинної експресії за злоякісного і доброякісного процесів у простаті потребує перевірки на ширшому матеріалі.



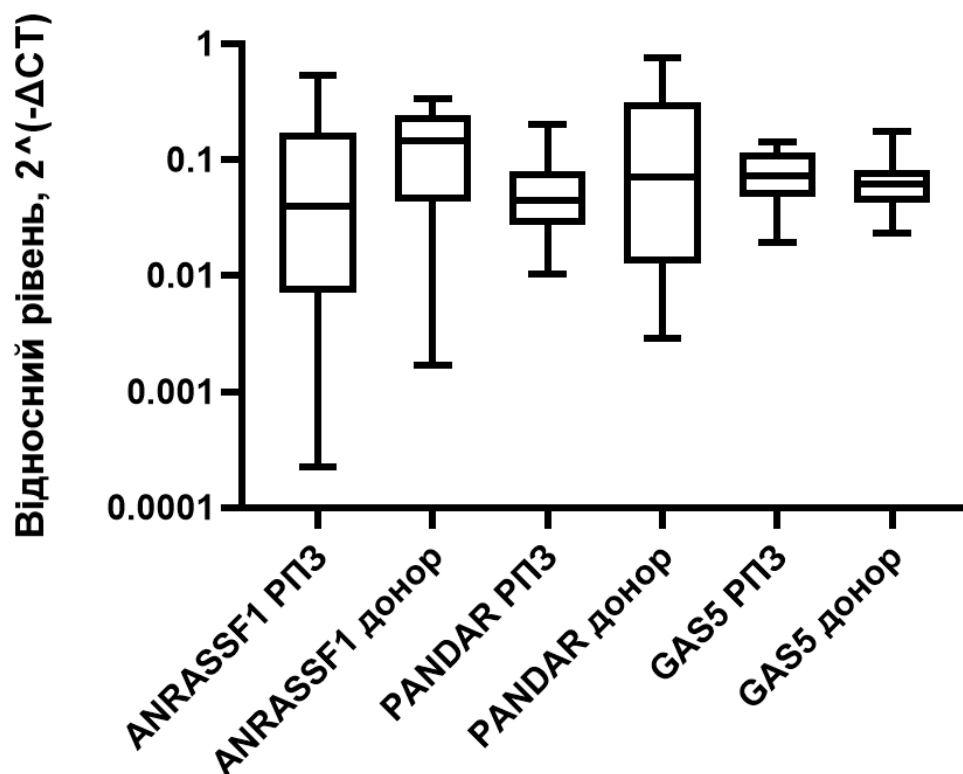
**Рис. 3.5.** Відносна експресія днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 у пухлинних тканинах передміхурової залози пацієнтів з РПЗ (Т) і тканинах аденоми передміхурової залози (А),  $M \pm SD$

Попри відсутність статистично значущих відмінностей, сам характер розподілу значень на рис. 3.5 заслуговує на увагу. Для GAS5 і PANDAR на графіку простежується тенденція до нижчих значень експресії в тканинах АПЗ порівняно з пухлинними тканинами РПЗ. Оскільки ці відмінності не досягли статистичної значущості, їх не можна інтерпретувати як підтверджену закономірність. Водночас така тенденція є цікавою саме з огляду на поставлене завдання порівняння РПЗ та АПЗ і може вказувати, що для окремих днРНК відмінності в експресії між злоякісною і доброякісною тканиною існують, але в межах наявної вибірки залишаються недостатньо вираженими або ж загалом мають помірніший характер, ніж можна було очікувати за даними огляду літератури.

### 3.2. Дослідження зразків сечі

Ми охарактеризували 19 зразків сечі пацієнтів з РПЗ та 11 зразків сечі здорових донорів за відносним рівнем днРНК ANRASSF1, PANDAR та GAS5, визначеним як співвідношення кількості транскриптів відповідної днРНК до кількості транскриптів ACTB та U6, оскільки стосовно сечі недоречно було б вживати термін «експресія». ДнРНК H19 у зразках сечі не проаналізували, оскільки для неї в значній частині зразків були отримані аномальні значення, які зберігалися і при повторному ПЛР. За результатами тесту з використанням критерію Пірсона нормальний розподіл даних у вибірках відсутній.

Ми встановили різницю у відносному рівні ANRASSF1, PANDAR та GAS5 між групою пацієнтів з РПЗ і здоровими донорами за допомогою тесту Манна-Вітні. Результати наведено на рис. 3.6.



**Рис. 3.6.** Відносні рівні ANRASSF1, PANDAR та GAS5 у сечі пацієнтів, хворих на РПЗ, і в сечі здорових донорів,  $M \pm SD$

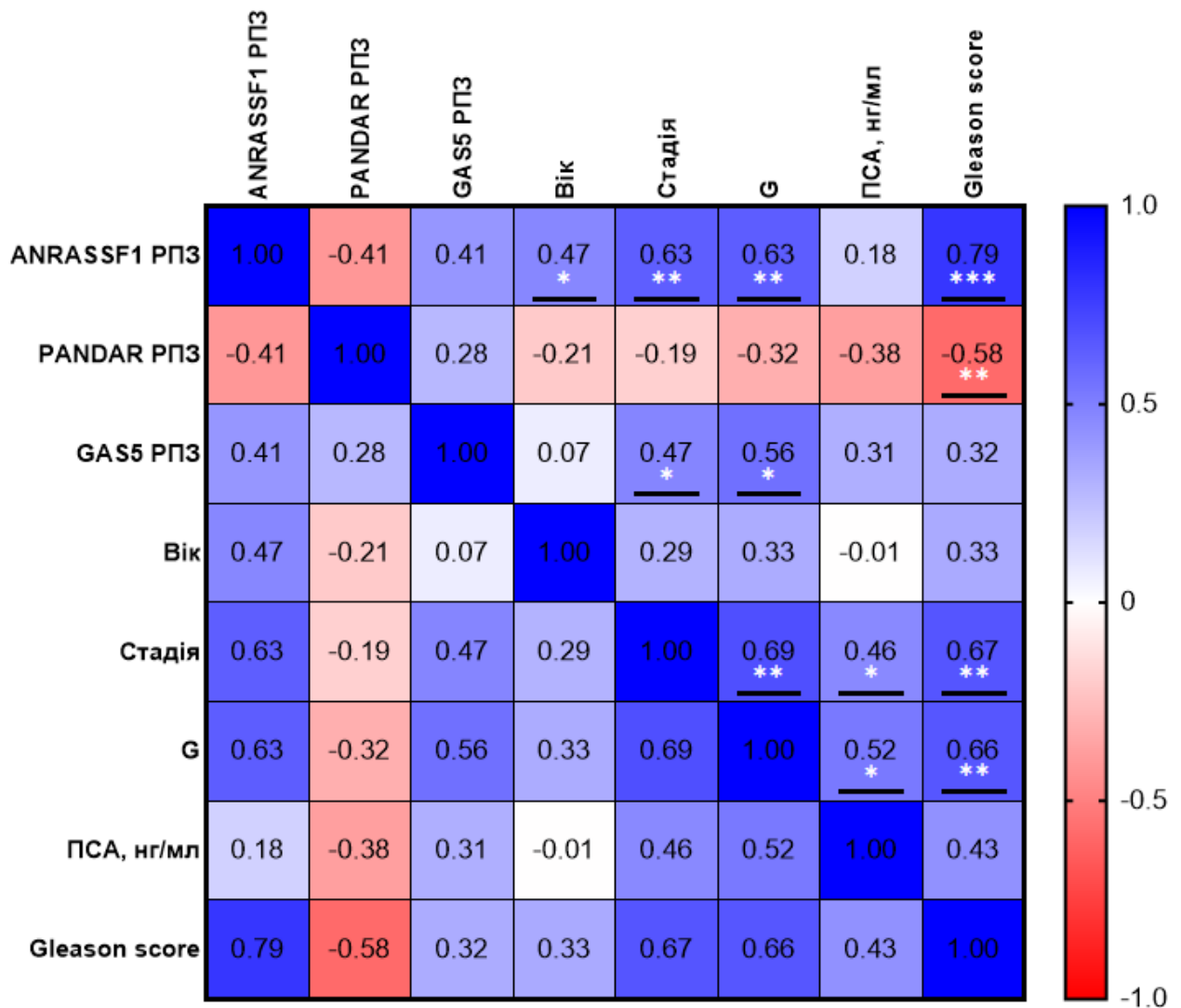
Статистично значущої різниці у відносних рівнях ANRASSF1, PANDAR та GAS5 не виявлено. Водночас на діаграмі можна помітити, що для ANRASSF1 і PANDAR відносний рівень у зразках сечі донорів є дещо вищим, тоді як для GAS5 вищі значення у вибірці пацієнтів з РПЗ.

З огляду на характер розподілу значень, можна припустити, що при збільшенні обсягу вибірки для окремих днРНК ці відмінності могли б бути підтверджені статистично. Це найбільш помітно для ANRASSF1, для якої отримане значення  $p = 0,2$  є меншим, ближчим до 0,05, ніж для інших досліджуваних днРНК, і вказує на наявність певної тенденції до відмінності між групами.

Ми також проаналізували наявність кореляцій між відносними рівнями днРНК у зразках сечі пацієнтів з РПЗ та клініко-патологічними характеристиками захворювання. Для цього використовували тест рангової кореляції Спірмена. Матриця кореляцій наведена на рис. 3.7.

Найбільшу кількість статистично значущих зв'язків виявлено для ANRASSF1: її відносний рівень у сечі позитивно корелював із віком пацієнтів ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,042$ ), стадією ( $r = 0,63$ ;  $p = 0,004$ ), ступенем злоякісності G ( $r = 0,63$ ;  $p = 0,004$ ) та Gleason score ( $r = 0,79$ ;  $p = 0,000068$ ). Для GAS5 встановлено статистично значущі позитивні кореляції зі стадією ( $r = 0,47$ ;  $p = 0,040$ ) та ступенем злоякісності G ( $r = 0,56$ ;  $p = 0,013$ ). Для PANDAR статистично значущим виявився лише зв'язок із Gleason score, причому він мав негативний характер ( $r = -0,58$ ;  $p = 0,009$ ). Між самими досліджуваними днРНК статистично значущих кореляцій у сечі не виявлено.

Отримані результати частково узгоджуються з даними огляду літератури. Найбільш послідовним у цьому відношенні є ANRASSF1: у літературі цю днРНК розглядають як локальний епігенетичний регулятор, пов'язаний із пригніченням онкосупресорної форми *RASSF1A* [19-21], тому її позитивний зв'язок зі стадією, ступенем злоякісності G та Gleason score не суперечить уявленню про її можливу участь у прогресуванні РПЗ.



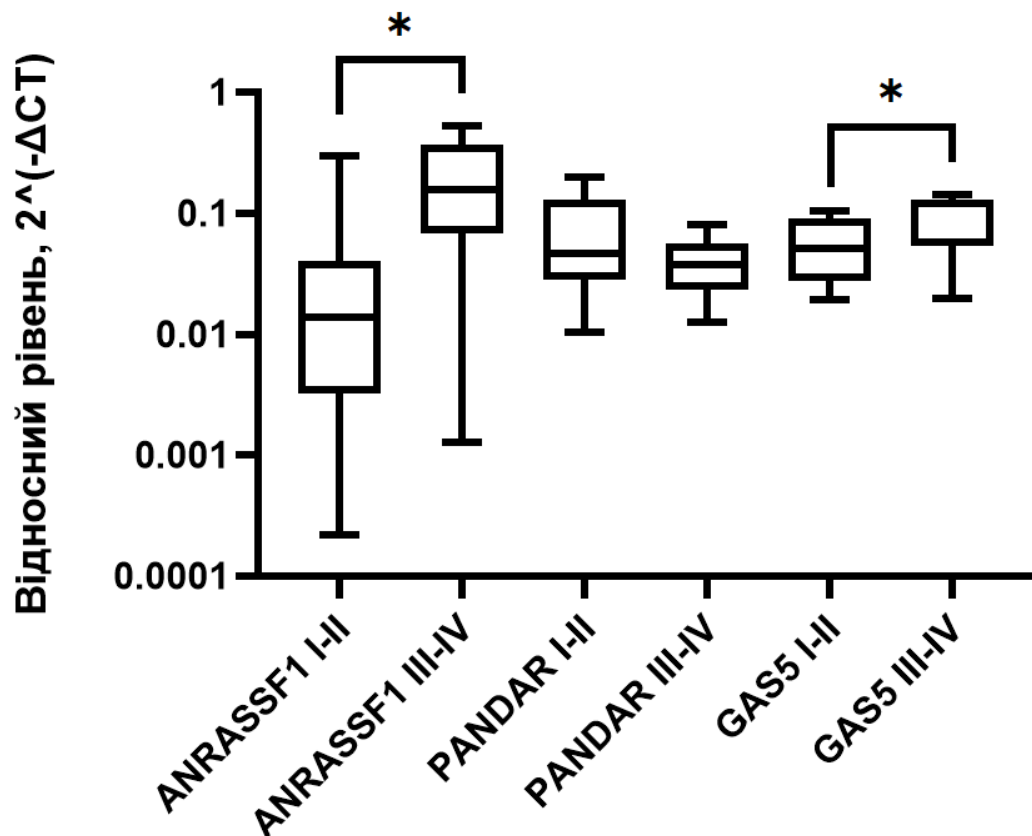
**Рис. 3.7.** Матриця кореляцій відносних рівнів днРНК ANRASSF1, PANDAR та GAS5 у зразках сечі пацієнтів, хворих на РПЗ, з клініко-патологічними характеристиками захворювання. \* – кореляція статистично-значуща за  $p \leq 0,05$ ; \*\* – кореляція статистично-значуща за  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* – кореляція статистично-значуща за  $p \leq 0,001$

Для GAS5 ситуація є менш однозначною, оскільки в огляді літератури вона переважно характеризувалася як онкосупресорна днРНК [25-27], тоді як у нашому дослідженні її відносний рівень у сечі позитивно корелював зі стадією та ступенем злоякісності G. Така невідповідність може бути пов'язана з тим, що рівень днРНК у сечі не обов'язково прямо відображає її функціональну роль у пухлинній тканині, а також із відомою неоднорідністю даних щодо GAS5, зокрема залежністю від окремих транскриптних варіантів.

Для PANDAR виявлена негативна кореляція з Gleason score також не повністю відповідає її описаному в літературі онкогенному профілю [22-24], тому цей результат доцільно інтерпретувати обережно.

Отже, у зразках сечі найбільш узгодженим з даними огляду літератури є саме профіль ANRASSF1, тоді як результати для GAS5 і PANDAR вказують на більш складний характер їх асоціацій із клініко-патологічними характеристиками РПЗ.

Серед 19 зразків сечі пацієнтів із РПЗ 11 увійшло у вибірку таких, які мають РПЗ I–II стадії, і 8 – у вибірку тих, які мають РПЗ III–IV стадій. Різниця у відносних рівнях досліджуваних днРНК між цими двома вибірками зображена на рис. 3.8.



**Рис. 3.8.** Відносні рівні ANRASSF1, PANDAR та GAS5 у сечі пацієнтів, які мають РПЗ I–II і III–IV стадій,  $M \pm SD$

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

Статистично значущими за результатами тесту Манна-Вітні є відмінності у відносних рівнях ANRASSF1 та GAS5. В обох випадках вищі значення спостерігаються у вибірці пацієнтів із РПЗ III–IV стадій. Для PANDAR статистично значущої різниці між вибірками не виявлено.

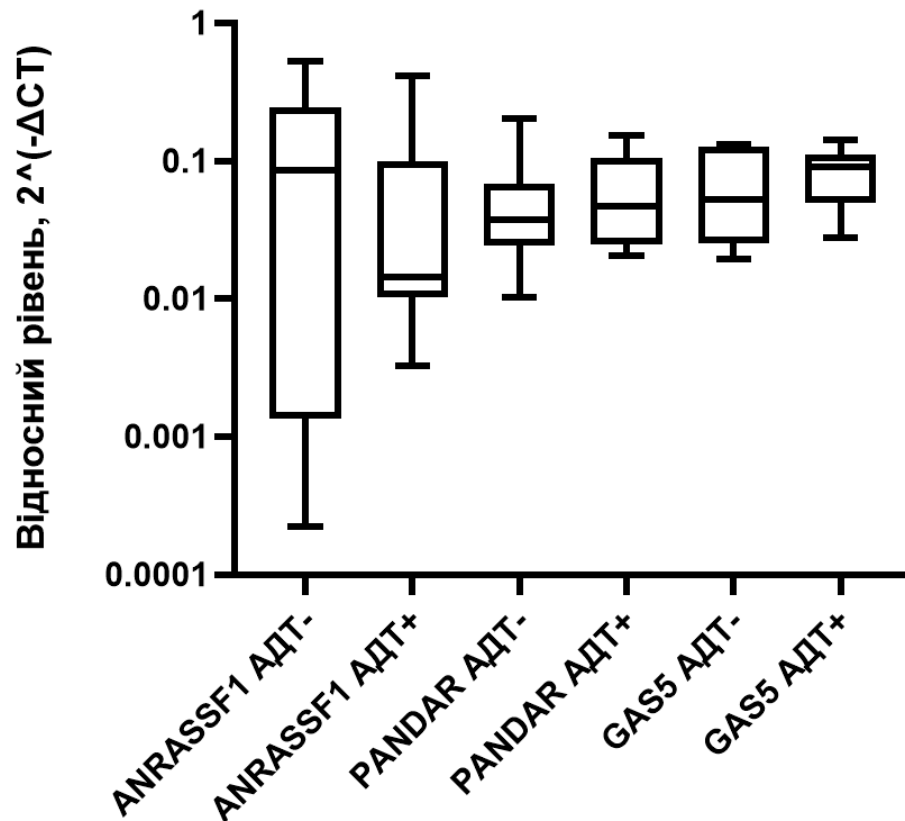
Отримані результати становлять інтерес на фоні даних з огляду літератури. Для ANRASSF1 вищий відносний рівень у сечі пацієнтів із пізнішими стадіями РПЗ узгоджується з тим, що в огляді літератури цю днРНК було охарактеризовано як таку, що пов'язана з репресією RASSF1A і, відповідно, може бути залученою до пухлинного прогресування [19-21].

Для GAS5 ситуація є менш однозначною, оскільки в огляді літератури її переважно було описано як онкосупресорну днРНК [25-27], однак у зразках сечі пацієнтів із РПЗ III–IV стадій її відносний рівень виявився вищим. Такий результат, разом із виявленими раніше кореляціями GAS5 зі стадією та показником G, може свідчити про те, що в сечі роль цієї днРНК проявляється складніше, ніж це можна було б очікувати лише з даних про її функціональну дію в тканині.

Отже, відносні рівні ANRASSF1 та GAS5 у сечі мають потенціал як прогностичні біомаркери РПЗ, тоді як для PANDAR такого потенціалу в межах дослідженої вибірки не встановлено.

Серед 19 зразків сечі пацієнтів із РПЗ 10 увійшло у вибірку таких, які не проходили гормональну терапію, і 9 – у вибірку тих, які її проходили. Різниця у відносних рівнях ANRASSF1, PANDAR та GAS5 між цими двома вибірками зображена на рис. 3.9.

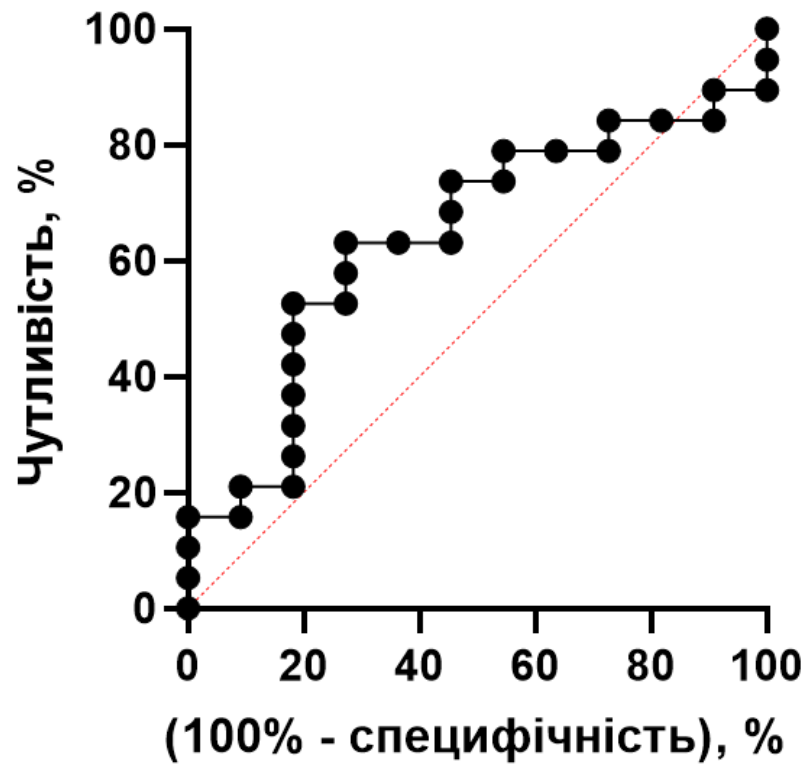
Статистично значущих відмінностей між вибірками АДТ- і АДТ+ для жодної з досліджуваних днРНК не виявлено. Отримані результати свідчать, що відносні рівні ANRASSF1, PANDAR та GAS5 у сечі не варто розглядати як потенційні біомаркери відповіді на гормональну терапію у пацієнтів з РПЗ.



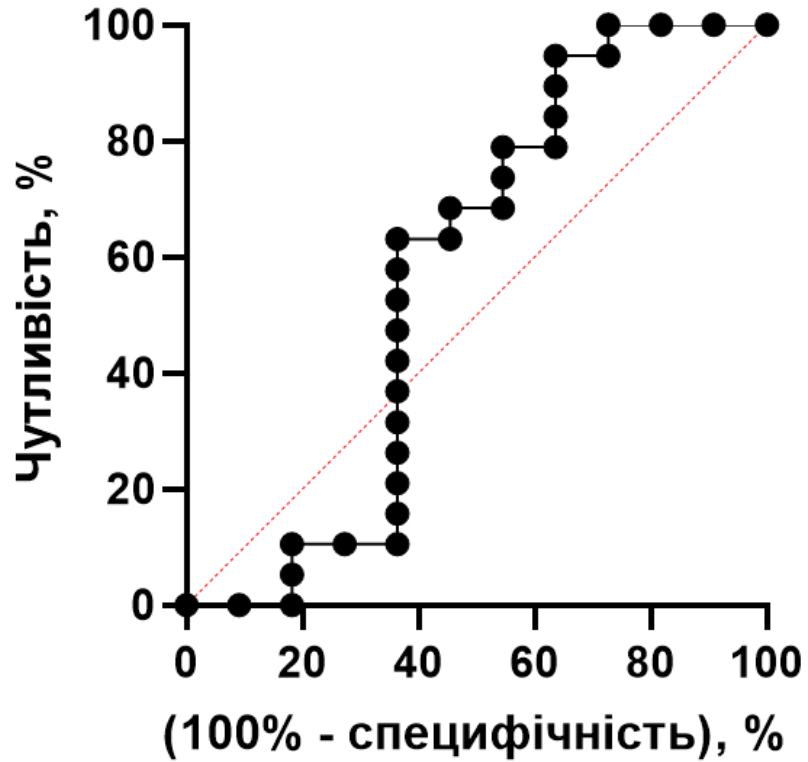
**Рис. 3.9.** Відносні рівні ANRASSF1, PANDAR та GAS5 у сечі пацієнтів, які не проходили гормональну терапію (АДТ-), і пацієнтів, які її проходили (АДТ+),  $M \pm SD$

Для детальнішої оцінки діагностичної цінності відносного рівня ANRASSF1 у сечі пацієнтів з РПЗ було побудовано ROC-криву на основі порівняння 19 зразків сечі пацієнтів з РПЗ і 11 зразків сечі здорових донорів. Результати аналізу наведено на рис. 3.10. Площа під ROC-кривою (AUC) для ANRASSF1 становила 0,6411,  $p = 0,2042$ . Отримане значення AUC перевищує 0,5, однак ця відмінність не є статистично значущою. Таким чином, у межах вибірки відносний рівень ANRASSF1 у сечі не продемонстрував достатньої діагностичної ефективності.

Такий самий аналіз було проведено для відносного рівня PANDAR у сечі. Результати аналізу наведено на рис. 3.11. Для PANDAR значення AUC становило 0,5694 при  $p = 0,5326$ , що так само не дозволяє розглядати цей показник як статистично значущий діагностичний критерій.

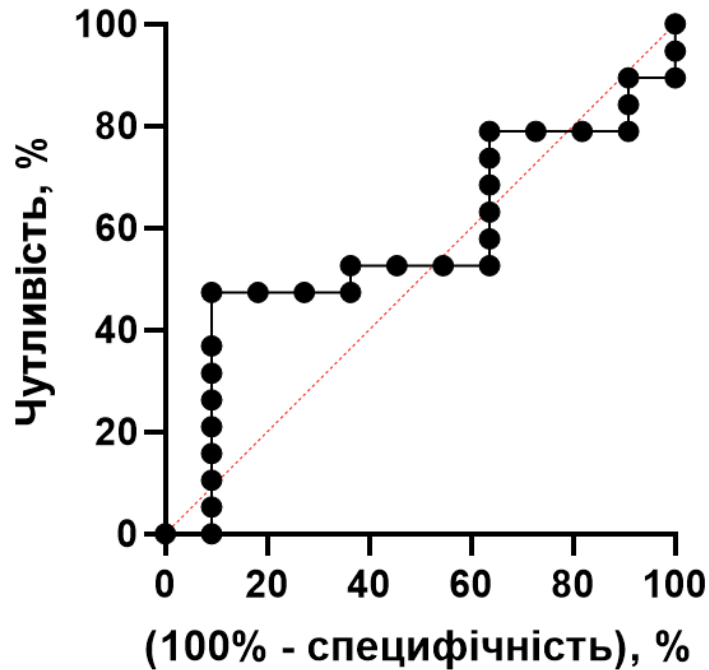


**Рис. 3.10.** ROC-аналіз відносного рівня ANRASSF1 у сечі як біомаркера наявності РПЗ



**Рис. 3.11.** ROC-аналіз відносного рівня PANDAR у сечі як біомаркера наявності РПЗ

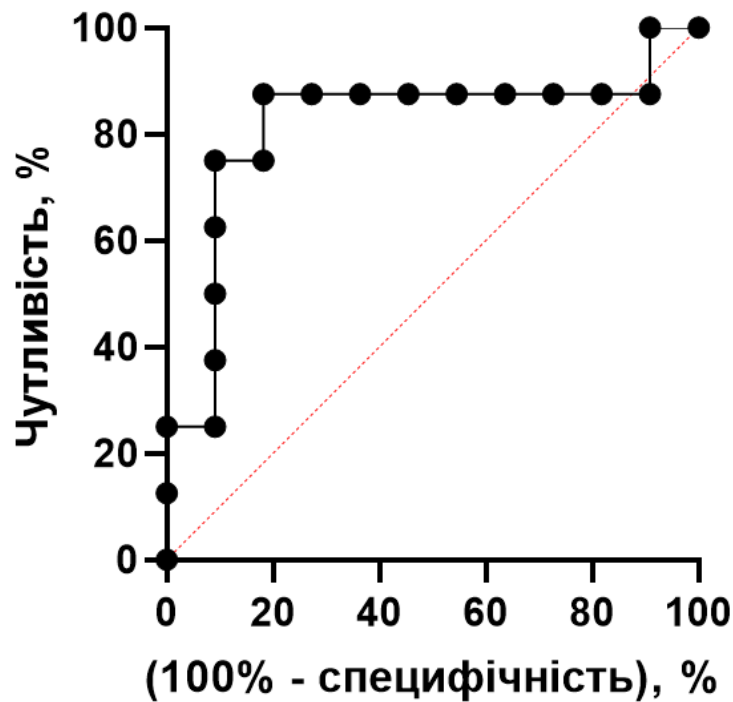
Для відносного рівня GAS5 у сечі значення AUC становило 0,5694 при  $p = 0,5326$  (рис. 3.12), що також не дозволяє розглядати цей показник як статистично значущий діагностичний критерій.



**Рис. 3.12.** ROC-аналіз відносного рівня GAS5 у сечі як біомаркера наявності РПЗ

Загалом отримані результати ROC-аналізу узгоджуються з попередніми даними прямого порівняння вибірок, у яких для відносного рівня ANRASSF1, PANDAR та GAS5 у сечі також не було виявлено статистично значущих відмінностей між пацієнтами з РПЗ і здоровими донорами. Це додатково підтверджує, що в межах дослідженої вибірки жодна з цих днРНК не продемонструвала достатньої діагностичної інформативності як самостійний біомаркер РПЗ.

Для оцінки прогностичної цінності відносного рівня ANRASSF1 у сечі пацієнтів з РПЗ було побудовано ROC-криву щодо розмежування вибірок пацієнтів із РПЗ I–II та III–IV стадій. Результати наведено на рис. 3.13.



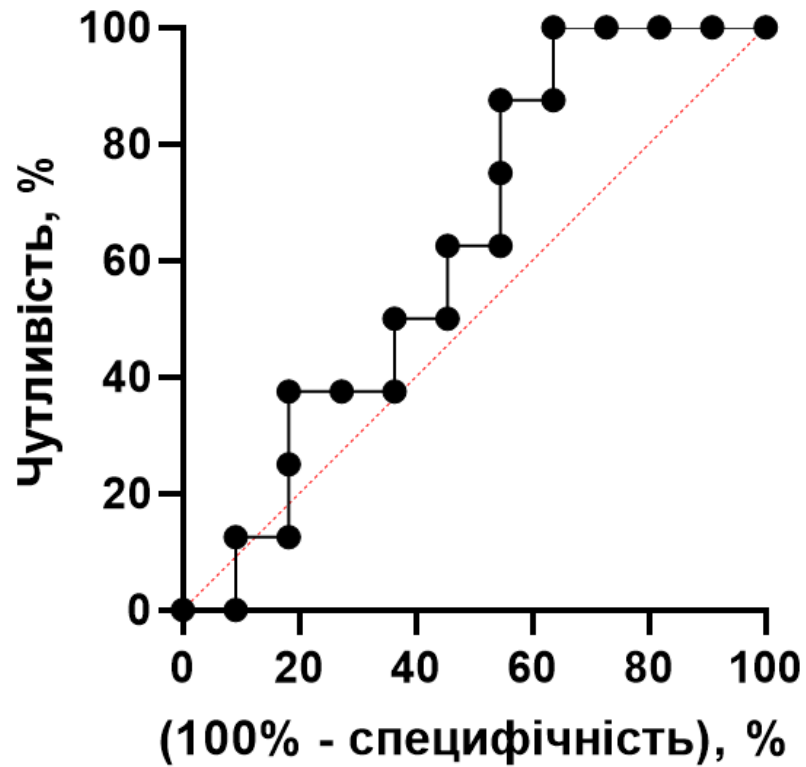
**Рис. 3.13.** ROC-аналіз відносного рівня ANRASSF1 у сечі як біомаркера стадії РПЗ

Для ANRASSF1 значення AUC становило 0,8182 при  $p = 0,0208$ , що вказує на здатність цього показника розмежовувати пацієнтів із ранніми та пізніми стадіями РПЗ.

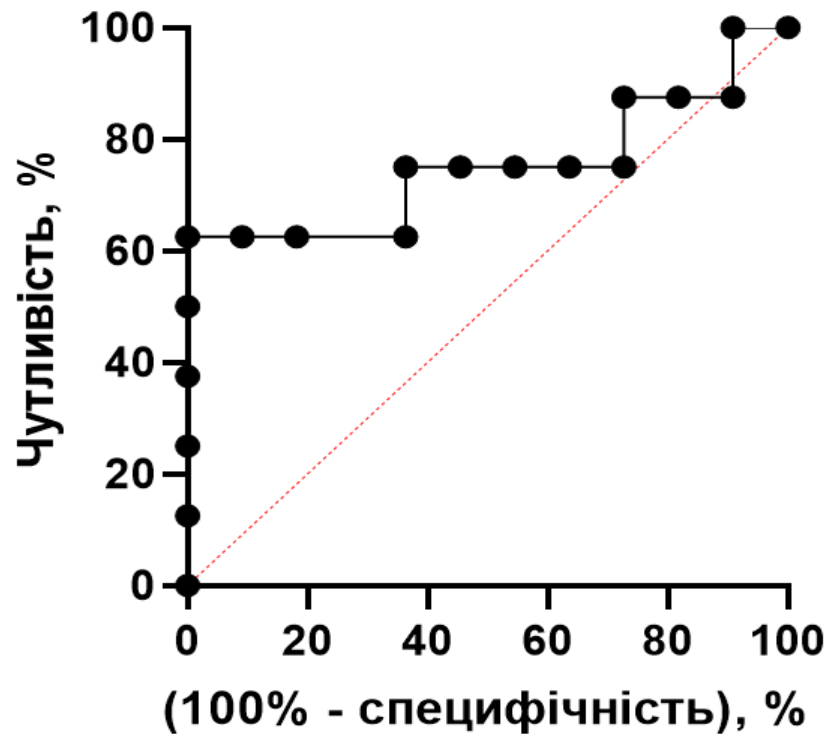
Під час огляду літератури не було виявлено робіт, у яких рівень днРНК ANRASSF1 оцінювали б саме в сечі пацієнтів з РПЗ. Наявні публікації стосуються переважно метилювання промотора RASSF1 [20, 21], а не рівня днРНК ANRASSF1. Тому виявлена в нашому дослідженні статистично значуща здатність ANRASSF1 у сечі розмежовувати пацієнтів із РПЗ I–II та III–IV стадій може розглядатися як нове спостереження, що не суперечить загальній ролі осі регуляції RASSF1 у прогресуванні пухлини.

ROC-аналіз для PANDAR наведено на рис. 3.14. Значення AUC становило 0,6250 при  $p = 0,3637$ , що не дозволяє розглядати відносний рівень PANDAR у сечі як статистично значущий прогностичний біомаркер.

ROC-аналіз для GAS5 наведено на рис. 3.15. Значення AUC становило 0,7500 при  $p = 0,0693$ , тобто не досягало рівня статистичної значущості, але наближалось до порогового значення  $p = 0,05$ .



**Рис. 3.14.** ROC-аналіз відносного рівня PANDAR у сечі як біомаркера стадії РПЗ



**Рис. 3.15.** ROC-аналіз відносного рівня GAS5 у сечі як біомаркера стадії РПЗ

Отриманий результат свідчить про прогностичний потенціал відносного рівня днРНК GAS5 у сечі, який з великою імовірністю може підтвердитися статистично на більшій вибірці.

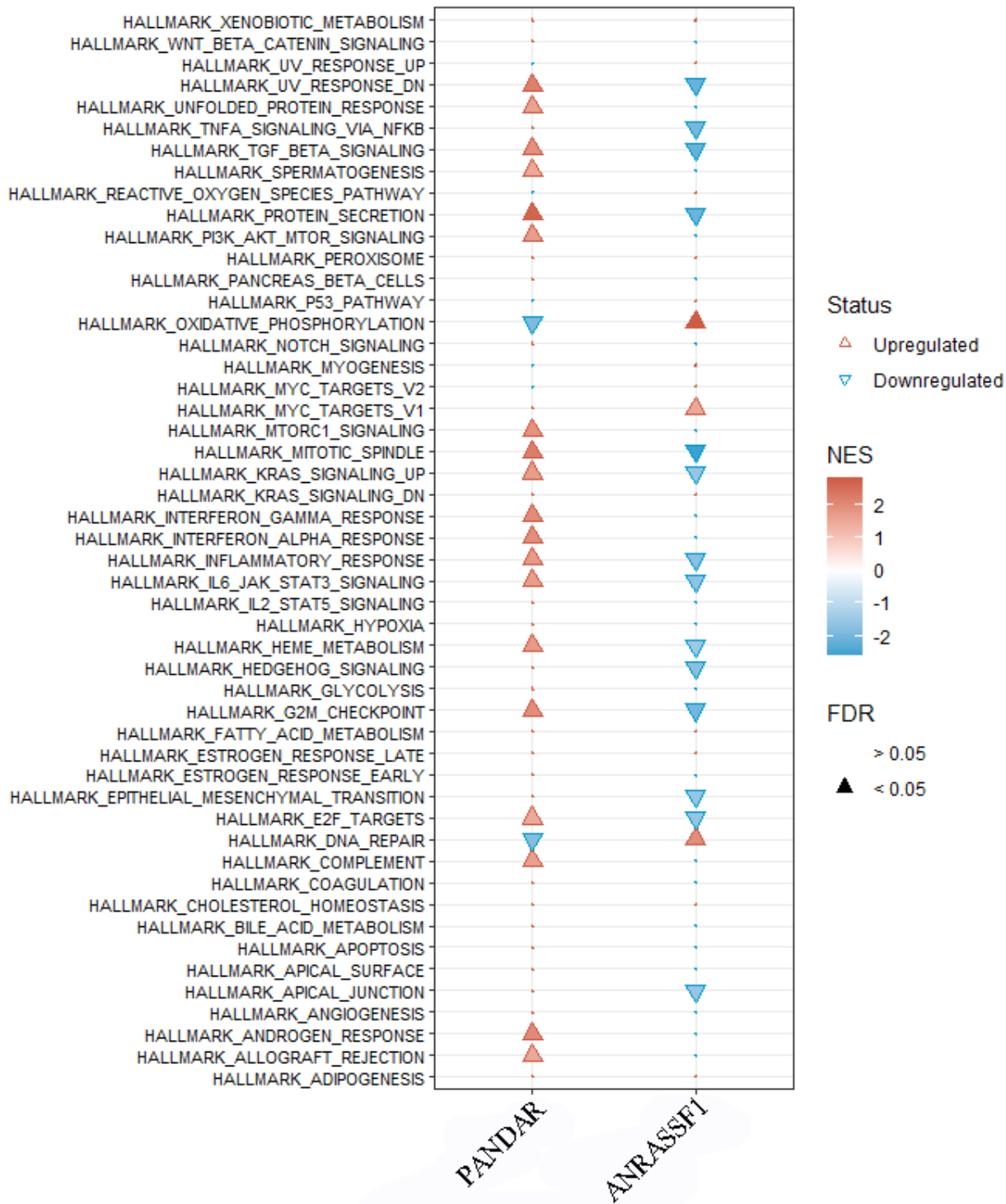
Отже, ANRASSF1 та GAS5 у зразках сечі показали високий прогностичний потенціал для визначення ускладнень РПЗ у пацієнтів, що є значно кращим результатом, ніж такий у вибірках тканин. Діагностичний потенціал жодна з досліджуваних днРНК не виявила.

### **3.3. Дослідження ізоформ вибраних довгих некодувальних РНК**

Досліджувані днРНК найчастіше представлені не однією ізоформою, а кількома, які потенційно можуть відрізнятися за своїми функціональними властивостями. У межах наших попередніх досліджень аналіз ізоформ уже було проведено для GAS5, і він показав наявність функціональних відмінностей, що пояснюють розбіжності в різних видах раку. Тому в даній роботі ми окремо проаналізували ізоформи ANRASSF1, PANDAR та H19.

Для ANRASSF1 і PANDAR у доступній когорті PRAD були наявні дані лише для однієї ізоформи, тому для цих днРНК ми могли лише оцінити, наскільки їх функціональні асоціації узгоджуються з даними літератури. Натомість для H19 у базі даних були представлені 7 ізоформ, що дозволило не лише зіставити результати з літературними даними, а й порівняти окремі ізоформи між собою.

Результати аналізу збагачення за функціональною приналежністю для PANDAR та ANRASSF1 наведено на рис. 3.16. Для PANDAR виявлено переважно позитивне збагачення наборів генів, пов'язаних із проліферацією і проходженням клітинного циклу, зокрема E2F\_TARGETS і G2M\_CHECKPOINT, а також наборів, що відображають активацію ростових і проонкогенних сигнальних шляхів, таких як KRAS\_SIGNALING\_UP, PI3K\_AKT\_MTOR\_SIGNALING і MTORC1\_SIGNALING.



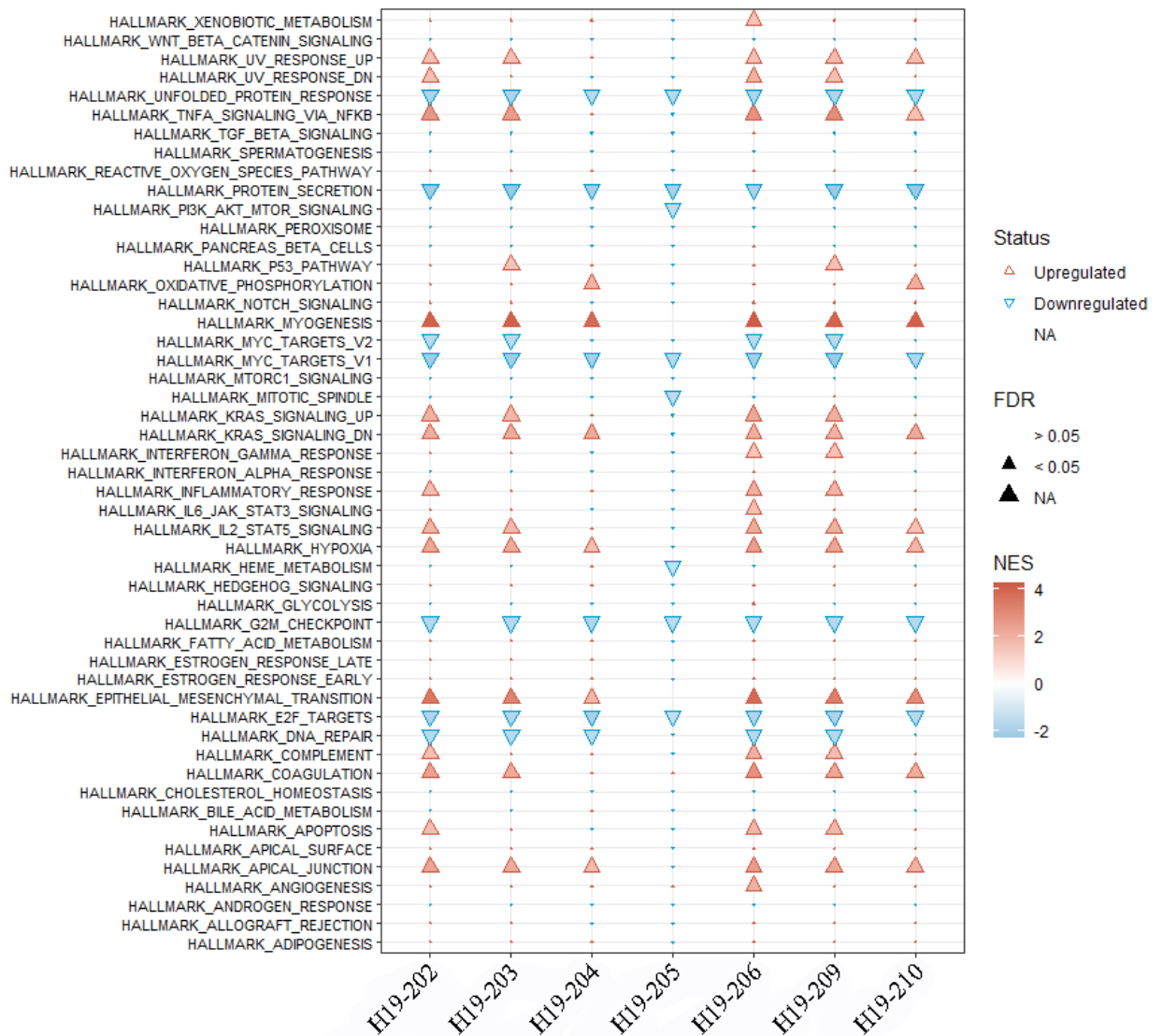
**Рис. 3.16.** Порівняльний GSEA днРНК PANDAR і ANRASSF1 на когорті PRAD-TCGA. Трикутники представляють статистично значущо регульовані шляхи

Крім того, для PANDAR спостерігалось збагачення наборів, пов'язаних із запальною та стрес-асоційованою сигнальною відповіддю, насамперед IL6\_JAK\_STAT3\_SIGNALING і TNFA\_SIGNALING\_VIA\_NFKB. Це добре

узгоджуються з даними огляду літератури, де PANDAR розглядалася як онкогенна днРНК [22-24].

Для ANRASSF1 результати виявилися менш однозначними. З одного боку, для неї спостерігалось позитивне збагачення наборів, пов'язаних із MYC-залежною транскрипційною активністю, а також із репарацією ДНК і окисним фосфорилуванням, що відповідає здоровому стану клітин. З іншого боку, для цієї ізоформи виявлено негативне збагачення наборів, пов'язаних із проліферацією (E2F\_TARGETS, G2M\_CHECKPOINT, MITOTIC\_SPINDLE), інвазивністю та клітинною пластичністю (EPITHELIAL\_MESENCHYMAL\_TRANSITION), а також із низкою проонкогенних сигнальних шляхів (KRAS\_SIGNALING\_UP, IL6\_JAK\_STAT3\_SIGNALING, TNFA\_SIGNALING\_VIA\_NFKB, TGF\_BETA\_SIGNALING). Тобто ANRASSF1 важко охарактеризувати як однозначно проонкогенну або онкосупресорну на основі GSEA-профілю. У порівнянні з даними огляду літератури, де ANRASSF1 розглядалася як онкогенна, ці результати вказують на складніший характер її дії.

Результати аналізу збагачення за функціональною приналежністю для ізоформ H19 наведено на рис. 3.17. Для більшості ізоформ H19 виявлено загалом подібний функціональний профіль. Для них характерне позитивне збагачення наборів, пов'язаних із гіпоксією та запально-стресовою відповіддю, зокрема HYPOXIA, TNFA\_SIGNALING\_VIA\_NFKB, IL2\_STAT5\_SIGNALING та UV\_RESPONSE\_UP, а також наборів, що відображають клітинну пластичність і взаємодію з мікрооточенням, насамперед EPITHELIAL\_MESENCHYMAL\_TRANSITION, COAGULATION та APICAL\_JUNCTION. Водночас для цих самих ізоформ спостерігалось негативне збагачення наборів, пов'язаних із проліферацією і проходженням клітинного циклу: E2F\_TARGETS, G2M\_CHECKPOINT, MYC\_TARGETS\_V1/V2, а також окремих наборів, пов'язаних із репарацією ДНК і секреторним навантаженням клітини, зокрема DNA\_REPAIR, PROTEIN\_SECRETION і UNFOLDED\_PROTEIN\_RESPONSE.



**Рис. 3.17.** Порівняльний GSEA ізоформ днРНК H19 на когорті PRAD-TCGA. Трикутники представляють статистично значущо регульовані шляхи

Такий профіль добре узгоджується з даними огляду літератури, де H19 при РПЗ розглядалася не як універсальний стимулятор проліферації, а як днРНК із виразно контекст-залежною дією, пов'язаною передусім із гіпоксією, клітинною адгезією, інвазивністю, метастатичним потенціалом і пластичністю пухлинних клітин [13, 32-37].

Окремі ізоформи H19 відрізнялися не напрямком асоціацій, а їхньою повнотою. Для H19-202, H19-203, H19-206, H19-209 та H19-210 зазначений профіль був виражений найповніше, тоді як для H19-204 він зберігався, але був менш насиченим. Найбільш відмінною виявилася ізоформа H19-205, для

якої практично не спостерігалось позитивного збагачення HALLMARK-наборів. Водночас вона не демонструвала і протилежного профілю щодо тих наборів, які в інших ізоформ були позитивно збагаченими; тобто її особливістю є не інший напрямок функціональних асоціацій, а радше редукований варіант загального профілю H19. У сукупності це свідчить, що H19 не є функціонально однорідною днРНК, однак більшість її ізоформ у когорті PRAD зберігають спільний загальний патерн асоціацій.

Підсумовуючи, у тканинних зразках статистично значущих відмінностей між групами не виявлено, але в пухлинній тканині простежувалися узгоджені зв'язки між ANRASSF1, PANDAR та H19, а експресія H19 позитивно корелювала зі ступенем злоякісності G. У сечі найбільш виразні асоціації виявлено для ANRASSF1: її відносний рівень позитивно корелював зі стадією, ступенем злоякісності G, Gleason score і віком. Для GAS5 встановлено позитивні кореляції зі стадією та G, тоді як для PANDAR виявлено негативну кореляцію з Gleason score.

При поділі зразків сечі за стадіями статистично значущо вищі рівні у пацієнтів із РПЗ III–IV стадій мали ANRASSF1 та GAS5. ROC-аналіз показав, що ANRASSF1 та GAS5 у сечі має високий прогностичний потенціал щодо стадії РПЗ, тоді як для діагностики наявності РПЗ жодна з досліджених днРНК достатньої інформативності не продемонструвала.

При GSEA-аналізі днРНК PANDAR виявила профіль, узгоджений з її онкогенним характером, ANRASSF1 показала змішаний профіль, а для H19 більшість ізоформ мали спільний онкогенний патерн асоціацій, при цьому H19-205 вирізнялася редукованим варіантом цього профілю.

Наведені дані показують, що досліджені днРНК не є функціонально однорідними і можуть по-різному проявлятися залежно від типу матеріалу та рівня аналізу. Зокрема, для H19 встановлено наявність кількох ізоформ зі спільним загальним патерном асоціацій, але з різною повнотою його прояву, тоді як для ANRASSF1 доступні дані вказують на відмінності у характері її дії порівняно з очікуваннями, сформованими на основі літератури. Це

підкреслює важливість урахування ізоформного складу днРНК при інтерпретації експресійних даних, а також при оцінюванні їх як потенційних біомаркерів або терапевтичних мішеней.

Отримані в роботі результати мають практичне значення насамперед у контексті пошуку нових прогностичних біомаркерів РПЗ. Хоча жодна з досліджених днРНК не продемонструвала достатньої діагностичної інформативності як самостійний біомаркер наявності РПЗ, для ANRASSF1 у сечі було показано статистично значущий зв'язок зі стадією захворювання, а для GAS5 – близьку до статистично значущої тенденцію в ROC-аналізі та значущі відмінності між ранніми і пізніми стадіями. Це дозволяє розглядати насамперед ANRASSF1, а також меншою мірою GAS5, як перспективні кандидати для подальшого використання у складі прогностичних панелей при РПЗ.

## ВИСНОВКИ

Поглиблено розуміння щодо днРНК ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 при раку передміхурової залози та оцінено їхній діагностичний і прогностичний потенціал у тканинах, сечі та на рівні ізоформ. Показано, що найбільший практичний інтерес серед досліджених днРНК мають ANRASSF1 і GAS5 у сечі як потенційні прогностичні біомаркери перебігу раку передміхурової залози.

1. Визначено, що в тканинах передміхурової залози експресія ANRASSF1, GAS5, PANDAR та H19 не володіє діагностичним потенціалом для диференціювання між пухлинною і парною умовно-нормальною тканиною, а також між тканиною РПЗ і аденоми передміхурової залози. Визначено статистично значущі кореляції між ANRASSF1, PANDAR та H19 у пухлинній тканині, а також кореляцію H19 зі ступенем злоякісності, що вказує на їх залученість до патології РПЗ, але не підтверджує їх придатності як тканинних діагностичних біомаркерів.

2. Показано, що у сечі ANRASSF1, GAS5 та PANDAR не є придатними як самостійні діагностичні біомаркери наявності РПЗ і не можуть бути рекомендовані як біомаркери відповіді на гормональну терапію. Водночас ANRASSF1 та меншою мірою GAS5 продемонстрували прогностичний потенціал щодо стадії РПЗ, тобто мають перспективу застосування як прогностичних біомаркерів РПЗ у сечі.

3. Встановлено, що для PANDAR єдина ізоформа має профіль, узгоджений з її онкогенним характером, тоді як для єдиної охарактеризованої ізоформи ANRASSF1 виявлено більш складний і менш однозначний характер функціональних асоціацій. Для H19 окремі ізоформи не є функціонально рівноцінними, але загалом ділять між собою спільний онкосупресорний профіль з різною силою. Це свідчить, що при оцінюванні днРНК як біомаркерів або потенційних терапевтичних мішеней при РПЗ необхідно враховувати ізоформний рівень їх організації.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Федоренко, З., Сумкіна, В. та Горох, Є. (2025). Бюлетень національного канцер-реєстру України № 26, [online]. Available at: [http://ncru.inf.ua/publications/BULL\\_26/PDF/Bull\\_26.pdf](http://ncru.inf.ua/publications/BULL_26/PDF/Bull_26.pdf) [Accessed 11 Feb. 2025].
2. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. and DePinho, R. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*, 32(17-18), pp. 1105–1140.
3. Sekhoacha, M., Riet, K., Motloun, P., Gumenku, L., Adegoke, A. and Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9457814/> [Accessed 5 Sep. 2026].
4. Chen, J., Zhang, D., Yan, W., Yang, D. and Shen, B. (2013). Translational bioinformatics for diagnostic and prognostic prediction of prostate cancer in the next-generation sequencing era. *Biomed Res Int*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727129/> [Accessed 15 Jul. 2013].
5. Williams, J., Greer, P. and Squire, J. (2014). Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genetics*, 207(10–12), pp. 474–488.
6. Packer, J. and Maitland, N. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp. 1238–1260.
7. Gleason, D. (1977). Histological grading and staging of prostatic carcinoma. In *Urologic Pathology: The Prostate*. Philadelphia: Lea & Feibiger. pp. 171–198.
8. Yegnasubramanian, S. (2016). Prostate cancer epigenetics and its clinical implications. *Asian journal of andrology*, 18(4), pp. 549–558.
9. Yegnasubramanian, S., De Marzo, A.-M. and Nelson, W. (2019). Prostate Cancer Epigenetics: From Basic Mechanisms to Clinical Implications.

*Cold Spring Harb Perspect Med*, [online]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29959132/> [Accessed 1 Apr. 2019].

10. Sun, D., Gan, X., Liu, L., Yang, Y., Ding, D., Li, W., Jiang, J., Ding, W., Zhao, L., Hou, G., Yu, J., Wang, J., Yang, F., Yuan, S. and Zhou, W. (2022). DNA hypermethylation modification promotes the development of hepatocellular carcinoma by depressing the tumor suppressor gene ZNF334. *Cell Death Dis*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9085879/> [Accessed 9 May 2022].

11. Sarhadi, V. and Armengol, G. (2022). Molecular Biomarkers in Cancer. *Biomolecules*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9331210/> [Accessed 23 Jul. 2022].

12. Su, Y., Yu, J., Huang, Y. and Yang, J. (2015). Circulating Long Noncoding RNA as a Potential Target for Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(6), pp. 13322–13338.

13. Zhu, M., Chen, Q., Liu, X., Sun, Q., Zhao, X., Deng, R., Wang, Y., Huang, J., Xu, M., Yan, J. and Yu, J. (2014). lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI. *FEBS J*, 281(16), pp. 3766–3775.

14. Naylor, S. (2003). Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3(5), pp. 525–529.

15. Pradeep, S., Neha, P., Ravindra, D., Shweta, P., Shilpi, C. and Tanushree, C. (2011). Biomarkers: An Emerging Tool for Diagnosis of a Disease and Drug Development. *Asian J. Res. Pharm. Sci*, 1(1), pp. 9–16.

16. Pardini, B., Sabo, A.-A., Birolo, G. and Calin, G.-A. (2019). Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Cancers (Basel)*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721601/> [Accessed 14 Aug. 2019].

17. Calanca, N., Paschoal, A.-P., Munhoz, É.-P., Galindo, L., Barbosa, B., Caldeira, J., Oliveira, R., Cavalli, L., Rogatto, S. and Rainho, C. (2019). The long non-coding RNA ANRASSF1 in the regulation of alternative protein-coding

transcripts RASSF1A and RASSF1C in human breast cancer cells: implications to epigenetic therapy. *Epigenetics*, 14(8), pp. 741–750.

18. Lei, B., Tian, Z., Fan, W. and Ni, B. (2019). Circular RNA: a novel biomarker and therapeutic target for human cancers. *International journal of molecular sciences*, 16(2), pp. 292–301.

19. Beckedorff, F.-C., Ayupe, A.-C., Crocci-Souza, R., Amaral, M.-S., Nakaya, H.-I., Soltys, D.-T., Menck, C.-F., Reis, E.-M. and Verjovski-Almeida, S. (2013). The intronic long noncoding RNA ANRASSF1 recruits PRC2 to the RASSF1A promoter, reducing the expression of RASSF1A and increasing cell proliferation. *PLoS genetics*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749938/> [Accessed 22 Aug. 2013].

20. Pan, J., Chen, J., Zhang, B., Chen, X., Huang, B., Zhuang, J., Mo, C. and Qiu, S. (2013). Association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779179/> [Accessed 20 Sep. 2013].

21. Raos, D., Ulamec, M., Katusic Bojanac, A., Bulic-Jakus, F., Jezek, D. and Sincic, N. (2021). Epigenetically inactivated RASSF1A as a tumor biomarker. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 21(4), pp. 386–397.

22. Zou, Y., Zhong, Y., Wu, J., Xiao, H., Zhang, X., Liao, X., Li, J., Mao, X., Liu, Y. and Zhang, F. (2017). Long non-coding PANDAR as a novel biomarker in human cancer: A systematic review. *Cell proliferation*, [online]. Available at: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6528858/> [Accessed 10 Dec. 2017].

23. Sun, Q. and Wang, X. (2021). Regulatory roles of lncRNA PANDAR in breast cancer cell proliferation. *Asian Biomedicine*, 15(6), pp. 285–291.

24. Qing, Y., Li, Q., Zhao, L.-Y., Shi, P., Shan, J.-L. and Zhang, W. (2021). LncRNA-PANDAR regulates the progression of thyroid carcinoma by targeting miR-637/KLK4. *Journal of Cancer*, 12(19), pp. 5879–5887.

25. Yang, X., Xie, Z., Lei, X. and Gan, R. (2020). Long non-coding RNA GAS5 in human cancer. *Oncology letters*, 20(3), pp. 2587–2594.
26. Luo, G., Liu, D., Huang, C., Wang, M., Xiao, X., Zeng, F., Wang, L. and Jiang, G. (2017). LncRNA GAS5 Inhibits Cellular Proliferation by Targeting P27Kip1. *Molecular Cancer Research*, 15(7), pp. 789–799.
27. Zhang, Y., Su, X., Kong, Z., Fu, F., Zhang, P., Wang, D., Wu, H., Wan, X. and Li, Y. (2017). An androgen reduced transcript of LncRNA GAS5 promoted prostate cancer proliferation. *PLoS ONE*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182305> [Accessed 3 Aug. 2017].
28. Hu, J., Deng, J., Cao, R., Xiong, S. and Guo, J. (2020). LncRNA GAS5 participates in the regulation of dexamethasone on androgen receptor-negative and -positive prostate cancer cell proliferation. *Mol Cell Probes*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101607> [Accessed 26 May 2020].
29. Ma, X., Wang, Z., Ren, H., Bao, X., Zhang, Y., Wang, B. and Ruan, D. (2020). Long Non-Coding RNA GAS5 Suppresses Tumor Progression and Enhances the Radiosensitivity of Prostate Cancer Through the miR-320a/RAB21 Axis. *Cancer Management and Research*, 12, pp. 8833–8845.
30. Lu, T., Tao, X., Li, H.-L., Gai, L., Huang, H. and Li, F. (2022). LncRNA GAS5 enhances tumor stem cell-like mediated sensitivity of paclitaxel and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the miR-18a-5p/STK4 pathway in prostate cancer. *Asian journal of andrology*, 24(6), pp. 643–652.
31. Coradduzza, D., Cruciani, S., Sibono, L., Tedde, A., Zinellu, A., Maioli, M., Cogoni, A.-A., De Miglio, M.-R., Medici, S., Madonia, M., Angius, A., Grosso, M. and Carru, C. (2025). Diagnostic relevance of Humanin, GAS5 and miR-21/miR-103 in prostate disease risk stratification. *Clinical and Experimental Medicine*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10238-025-01810-z> [Accessed 6 Aug. 2025].
32. Bacci, L., Aiello, A., Ripoli, C., Loria, R., Pugliese, D., Pierconti, F., Rotili, D., Strigari, L., Pinto, F., Bassi, P.-F., Mai, A., Grassi, C., Pontecorvi, A.,

Falcioni, R., Farsetti, A. and Nanni, S. (2019). H19-Dependent Transcriptional Regulation of  $\beta 3$  and  $\beta 4$  Integrins Upon Estrogen and Hypoxia Favors Metastatic Potential in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20164012> [Accessed 17 Aug. 2019].

33. Singh, N., Ramnarine, V.-R., Song, J.-H., Pandey, R., Padi, S.-K.-R., Nouri, M., Olive, V., Kobelev, M., Okumura, K., McCarthy, D., Hanna, M.-M., Mukherjee, P., Sun, B., Lee, B.-R., Parker, J.-B., Chakravarti, D., Warfel, N.-A., Zhou, M., Bearss, J.-J., Gibb, E.-A., Alshalalfa, M., Karnes, R.-J., Small, E.-J., Aggarwal, R., Feng, F., Wang, Y., Buttyan, R., Zoubeidi, A., Rubin, M., Gleave, M., Slack, F.-J., Davicioni, E., Beltran, H., Collins, C. and Kraft, A.-S. (2021). The long noncoding RNA H19 regulates tumor plasticity in neuroendocrine prostate cancer. *Nature Communications*, [online]: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26901-9> [Accessed 21 Dec. 2021].

34. Pecci, V., Troisi, F., Aiello, A., De Martino, S., Carlino, A., Fiorentino, V., Ripoli, C., Rotili, D., Pierconti, F., Martini, M., Porru, M., Pinto, F., Mai, A., Bassi, P.-F., Grassi, C., Gaetano, C., Pontecorvi, A., Strigari, L., Farsetti, A. and Nanni, S. (2024). Targeting of H19/cell adhesion molecules circuitry by GSK-J4 epidrug inhibits metastatic progression in prostate cancer. *Cancer Cell International*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03231-6> [Accessed 5 Feb. 2024].

35. Pecci, V., Pierconti, F., Carlino, A., Pinto, F., Gradilone, U., De Martino, S., Rotili, D., Grassi, C., Pontecorvi, A., Gaetano, C., Strigari, L., Farsetti, A. and Nanni, S. (2024). Prognostic Impact of H19/Cell Adhesion Molecules Circuitry on Prostate Cancer Biopsy. *Biomedicines*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102322> [Accessed 12 Oct. 2024].

36. You, P., Tang, L., Zhu, Y. and Tian, Y. (2023). Brevilin A shows an anti-tumor role in prostate cancer via the lncRNA H19/miR-194/E2F3 signaling pathway. *Aging*, 15(10), pp. 4411–4428.

37. Ozgur, E. and Gezer, U. (2020). Investigation of lncRNA H19 in prostate cancer cells and secreted exosomes upon androgen stimulation or androgen receptor blockage. *Bratislava Medical Journal*, 121(5), pp. 362–365.
38. Wang, Y., Wang, J., Liu, J. and Zhu, H. (2024). Immune-related diagnostic markers for benign prostatic hyperplasia and their potential as drug targets. *Frontiers in Immunology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1516362> [Accessed 5 Dec. 2024].
39. Hata, J., Harigane, Y., Matsuoka, K., Akaihata, H., Yaginuma, K., Meguro, S., Hoshi, S., Sato, Y., Ogawa, S., Uemura, M. and Kojima, Y. (2023). Mechanism of Androgen-Independent Stromal Proliferation in Benign Prostatic Hyperplasia. *International Journal of Molecular Sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241411634> [Accessed 19 Jul. 2023].
40. Kaltsas, A., Giannakas, T., Stavropoulos, M., Kratiras, Z. and Chrisofos, M. (2025). Oxidative Stress in Benign Prostatic Hyperplasia: Mechanisms, Clinical Relevance and Therapeutic Perspectives. *Diseases*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/diseases13020053> [Accessed 11 Feb. 2025].
41. Liu, J., Zhang, J., Fu, X., Yang, S., Li, Y., Liu, J., DiSanto, M.-E., Chen, P. and Zhang, X. (2023). The Emerging Role of Cell Adhesion Molecules on Benign Prostatic Hyperplasia. *International Journal of Molecular Sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24032870> [Accessed 2 Feb. 2023].
42. Sun, S.-C., Zhao, H., Liu, R., Wang, B.-L., Liu, Y.-Q., Zhao, Y. and Shi, Z.-D. (2017). Expression of long non-coding RNA H19 in prostate cancer and its effect on the proliferation and glycometabolism of human prostate cancer cells. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 23(2), pp. 120–124.
43. Esfandi, F., Mirjafari, S.-A., Rezazadeh, N., Seyyedesfahani, V., Nicknam, A., Eslami, S., Sharifi, G., Dilmaghani, N.-A., Sayad, A. and Ghafouri-Fard, S. (2024). Differential expression of cancer-related lncRNAs in different subtypes of pituitary adenomas. *Pathology - Research and Practice*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155421> [Accessed 20 Aug. 2024].

44. Verdelli, C., Fabrizio, F.-P., Maroni, P., Morotti, A., Tavanti, G., Carrara, S., Guarnieri, V., Cetani, F., Scillitani, A., Maggiore, R., Perticone, F., Vaira, V., Muscarella, L. and Corbetta, S. (2025). Aberrant promoter methylation, expression and function of RASSF1A gene in a series of Italian parathyroid tumors. *Endocrine*, 87(3), pp. 1246–1256.
45. Wu, Z.-R., Yan, L., Liu, Y.-T., Cao, L., Guo, Y.-H., Zhang, Y., Yao, H., Cai, L., Shang, H.-B., Rui, W.-W., Yang, G., Zhang, X.-B., Tang, H., Wang, Y., Huang, J.-Y., Wei, Y.-X., Zhao, W.-G., Su, B. and Wu, Z.-B. (2018). Inhibition of mTORC1 by lncRNA H19 via disrupting 4E-BP1/Raptor interaction in pituitary tumours. *Nature Communications*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06853-3> [Accessed 5 Nov. 2018].
46. Lu, T., Yu, C., Ni, H., Liang, W., Yan, H. and Jin, W. (2018). Expression of the long non-coding RNA H19 and MALAT-1 in growth hormone-secreting pituitary adenomas and its relationship to tumor behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 67, pp. 46–50.
47. Wu, Z., Zheng, Y., Xie, W., Li, Q., Zhang, Y., Ren, B., Cai, L., Cheng, Y., Tang, H., Su, Z. and Wu, Z.-B. (2020). The long noncoding RNA-H19/miRNA-93a/ATG7 axis regulates the sensitivity of pituitary adenomas to dopamine agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111033> [Accessed 15 Sep. 2020].
48. Wang, H., Wu, B., Wang, H., Jiang, C. and Liu, Z. (2022). LncRNA growth arrest specific transcript 5 inhibits the growth of pituitary neuroendocrine tumors via miR-27a-5p/cylindromatosis axis. *Bioengineered*, 13(4), pp. 10274–10286.
49. Amelio, I., Bertolo, R., Bove, P., Buonomo, O.-C., Candi, E., Chiocchi, M., Cipriani, C., Di Daniele, N., Ganini, C., Juhl, H., Mauriello, A., Marani, C., Marshall, J., Montanaro, M., Palmieri, G., Piacentini, M., Sica, G., Tesauro, M., Rovella, V., Tisone, G., Shi, Y., Wang, Y. and Melino, G. (2020). Liquid biopsies and cancer omics. *Cell death discovery*, [online]. Available at:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7691330/> [Accessed 26 Nov. 2020].

50. Li, P., Liu, S., Du, L., Mohseni, G., Zhang, Y. and Wang, C. (2022). Liquid biopsies based on DNA methylation as biomarkers for the detection and prognosis of lung cancer. *Clinical epigenetics*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9509651/> [Accessed 24 Sep. 2022].

51. Wang, S., Zhang, K., Tan, S., Xin, J., Yuan, Q., Xu, H., Xu, X., Liang, Q., Christiani, D.-C., Wang, M., Liu, L. and Du, M. (2021). Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Molecular cancer*, [online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7798340/> [Accessed 11 Jan. 2021].

52. Oshi, M., Murthy, V., Takahashi, H., Huyser, M., Okano, M., Tokumaru, Y., Rashid, O. M., Matsuyama, R., Endo, I. and Takabe, K. (2021). Urine as a Source of Liquid Biopsy for Cancer. *Cancers*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13112652> [Accessed 28 May 2021].

53. Gunasekaran, P.-M., Luther, J.-M. and Byrd, J.-B. (2019). For what factors should we normalize urinary extracellular mRNA biomarkers? *Biomolecular detection and quantification*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100090> [Accessed 23 Apr. 2019].

54. Schmittgen, T.-D. and Livak, K.-J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), pp. 1101–1108.

55. Qiwei, D., Yue, Y., Xuandong, K., Fang, L., Jiancheng, S., Haote, Z., Yixiu, N. and Anping, P. (2018). Circulating lncRNAs acting as diagnosis fingerprints for predicting triple negative breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 11(8), pp. 8139–8145.

56. Xu, Y., Jiang, X. and Cui, Y. (2017). Upregulated long noncoding RNA PANDAR predicts an unfavorable prognosis and promotes tumorigenesis in cholangiocarcinoma. *OncoTargets and therapy*, 10, pp. 2873–2883.

57. Jie, L., Chen, Y., Yinguang, L., Aiyue, C., Li, L. and Zeshan, Y. (2018). LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer by inducing inflammasome formation. *Biosci Rep*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1042/BSR20171150> [Accessed 16 Mar. 2018].
58. Shang, A., Wang, W., Gu, C., Chen, W., Lu, W., Sun, Z. and Li, D. (2020). Long non-coding RNA CCAT1 promotes colorectal cancer progression by regulating miR-181a-5p expression. *Aging*, 12(9), pp. 8301–8320.

## КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблиця А1

## Клініко-патологічні характеристики зразків тканин РПЗ

| Пацієнт | Вік | Стадія | Наявність метастазів | G | ПСА, нг/мл | Gleason score після операції | Стаж паління, років (1-10 - 1, 11-20 - 2, 20+ - 3) | Родинний анамнез раку | Наявність лікування |
|---------|-----|--------|----------------------|---|------------|------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| P151    | 48  | I      | -                    | 1 | 5,3        | 6                            | 0                                                  | -                     | +                   |
| P123    | 55  | II     | -                    | 2 | 5,51       | 7                            | 0                                                  | -                     | -                   |
| P137    | 56  | II     | -                    | 2 | 36         | 7                            | 0                                                  | +                     | -                   |
| P165    | 57  | III    | -                    | 3 | 7,4        | 8                            | 3                                                  | +                     | +                   |
| P125    | 60  | I      | -                    | 2 | 47,1       | 6                            | 3                                                  | -                     | -                   |
| P174    | 62  | IV     | +                    | 4 | 40         | 8                            | 2                                                  | -                     | +                   |
| P141    | 62  | II     | -                    | 1 | 1,73       | 6                            | 0                                                  | +                     | +                   |
| P122    | 64  | II     | -                    | 1 | 24         | 6                            | 0                                                  | -                     | -                   |
| P162    | 64  | III    | -                    | 3 | 82         | 9                            | 0                                                  | +                     | -                   |
| P154    | 65  | II     | -                    | 1 | 7,44       | 7                            | 0                                                  | -                     | -                   |
| P108    | 65  | III    | +                    | 2 | 20         | 8                            | 3                                                  | -                     | +                   |
| P129    | 66  | III    | -                    | 3 | 11         | 9                            | 0                                                  | -                     | -                   |
| P113    | 67  | II     | -                    | 3 | 11,6       | 8                            | 0                                                  | -                     | +                   |
| P161    | 67  | III    | -                    | 2 | 39,33      | 6                            | 0                                                  | -                     | +                   |
| P138    | 68  | III    | -                    | 3 | 51         | 9                            | 3                                                  | +                     | -                   |
| P104    | 68  | III    | -                    | 1 | 10,5       | 9                            | 3                                                  | -                     | -                   |
| P190    | 69  | II     | -                    | 2 | 6          | 7                            | 0                                                  | -                     | -                   |
| P133    | 69  | III    | -                    | 4 | 10,9       | 9                            | 3                                                  | -                     | +                   |
| P157    | 69  | III    | -                    | 3 | 25,9       | 9                            | 3                                                  | -                     | +                   |
| P163    | 70  | IV     | -                    | 4 | 7          | 9                            | 0                                                  | -                     | +                   |
| P140    | 70  | II     | -                    | 3 | 18         | 9                            | 0                                                  | +                     | +                   |
| P152    | 72  | II     | -                    | 1 | 4,31       | 6                            | 0                                                  | -                     | -                   |