

22 urine samples from patients with prostate cancer (PCa) were gathered after prostate massage before surgical invasion. We used urine samples from 6 healthy men as control. We obtained cells from each urine sample by centrifugation and isolated RNA using a standard approach with phenol and guanidine thiocyanate. cDNA was synthesized and taken to qPCR reactions. The data were statistically analysed.

The results demonstrated that the differential expression of all these genes can be identified in urine in samples from people both with diagnosed cancer and healthy individuals. Among gene expression inside Aurora kinase family, the expression level of Aurora B and Aurora C was significantly higher than the expression of Aurora A. The cumulative expression AURB and AURC was higher than expression of AURA in 13 samples out of 22 in the prostate cancer sample. Moreover, we observed positive correlation between expression of AURC and BRAF in prostate cancer samples ($r_s = 0,548$, $p = 0,01$), which leads to the conclusion that there is joint and / or mutual regulation of expression of these genes.

Keywords: Aurora A, Aurora B, Aurora C, cell cycle, carcinogenesis, prostate cancer, MAPK.

Матеріал надійшов 15.03.2016

УДК 57.052

Маньковська О. С., Скрипнікова О. С., Панасенко Г. В., Вікарчук М. В.,
Кононенко О. А., Стаховський Е. О., Кашуба В. І.

ВИЯВЛЕННЯ МЕТИЛЮВАННЯ ГЕНІВ *VIM*, *TMEFF2* І *GDF15* У СЕЧІ ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА РАК СЕЧОВОГО МІХУРА, В УКРАЇНСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ

Рак сечового міхура є одним із найпоширеніших в Україні та світі, проблема його ранньої діагностики досі є нерозв'язаною. Використання епігенетичних маркерів, а саме виявлення метилювання генів-онкосупресорів, є перспективним засобом для оцінки ризиків цього захворювання і раннього його виявлення, проте має популяційні особливості. Метою цієї роботи було перевірити, чи виявляється метилювання генів *GDF15*, *TMEFF2* і *VIM* у сечі хворих на рак сечового міхура в українській популяції і чи можна застосовувати цю комбінацію метилюваних генів як інформативну панель онкомаркерів. Ми виявили наявність метилювання усіх трьох генів серед досліджуваних хворих ($n = 42$), при цьому жоден не детектувався у нормі ($n = 5$). Чутливість цієї комбінації потенційних маркерів становила 69 %, специфічність – 100 %. Було зроблено висновок про необхідність розширення вибірки і перевірки диференціовальної здатності *GDF15*, *TMEFF2* і *VIM* для раку сечового міхура порівняно з іншими онкоурологічними патологіями.

Ключові слова: метилювання, гени-онкосупресори, рак сечового міхура, рання діагностика, онкомаркери, *GDF15*, *TMEFF2*, *VIM*.

Вступ

Рак сечового міхура сьогодні є однією з найактуальніших проблем онкоурології. Це зумовлено значною частотою захворювання з тенденцією до її зростання, особливостями клініки і перебігу хвороби, відсутністю єдиних підходів до лікування залежно від стадії та ступеня диференцію-

вання пухлини. За даними світової статистики, рак сечового міхура посідає 6-те місце серед онкологічних захворювань загалом, 3-тє місце серед урологічної та 2-ге (відповідно 50–72 %) серед онкоурологічної патології. У світі щороку діагностують 380 тисяч нових випадків раку сечового міхура і близько 150 тисяч летальних випадків цього захворювання [1].

Кількість хворих на рак сечового міхура зростає кожні 5 років більш ніж на 20 %. В Україні цей вид раку займає 3-тє місце серед онкологічних захворювань у чоловіків і 15-тє місце – серед жінок. За прогнозами лікарів, сьогодні зберігається тенденція до зростання захворюваності в 1,4, поширеності – в 2,9, смертності – в 2,8 разу [2; 3].

Отже, у світі існує невирішена проблема діагностики і лікування раку сечового міхура. У її межах найактуальнішими є два завдання: рання діагностика, яка б давала змогу виявити пухлину на дуже ранній стадії, або навіть виявити підвищений ризик її появи до розвитку онкологічного захворювання, і прогнозування перебігу захворювання з оцінкою ймовірності виникнення рецидиву у кожного конкретного хворого.

У біологічних рідинах онкохворих було виявлено підвищену кількість циркулюючих нуклеїнових кислот, зокрема так званої вільної циркулюючої ДНК (circulating free, або cell-free DNA (CFDNA)). Клітини пухлини, руйнуючись, вивільняють свій вміст у довколишнє середовище, при цьому їхня ДНК циркулює в організмі у вигляді нуклеопротейнових комплексів [4].

Оскільки найбільш спорідненою до уrogenітального тракту біологічною рідиною є сеча, вона показала себе як найкраще за доступністю та інформативністю джерело для урологічних захворювань, зокрема для раку сечового міхура.

Існують біохімічні маркери, але їхні чутливість і специфічність не відповідають критеріям превентивності і часто детектуються уже на стадії захворювання, яка потребує хірургічного втручання [5]. Тому зараз триває інтенсивний пошук нових підходів, і одним із них є виявлення змін, що виникають у клітинах внаслідок епігенетичних процесів: метилування ДНК і гістонів, регуляція експресії генів некодуючими РНК тощо.

Відомо, що більшість мутацій при онкогенезі призводить до втрати функції гена. Метилування промоторів генів онкосупресорів може спричинити такі самі наслідки. Це ковалентна модифікація ДНК за рахунок приєднання метилтрансферазами метильних груп до цитозину у GC-багатих ділянках гена (CpG-острівці), розташованих переважно в регіоні промотора, що призводить до його мовчання [6]. Епігенетичне мовчання гена при онкологічних захворюваннях виникає приблизно з тією самою частотою, що й мутації [7]. Епігенетичні модифікації успадковуються як у результаті мітотичного поділу, так і в результаті мейозу, і сьогодні вважають, що іноді метилування генів онкосупресорів має

не спорадичний характер, а передається від батьків до дитини, що свідчить про можливість спадкування схильності до розвитку онкозахворювання за епігенетичним механізмом [8].

Було показано, що різні типи раку відрізняються за рівнем метилування і за набором генів онкосупресорів, які метилуються [9]. Крім того, малігнізація клітин одного типу (наприклад епітеліальних), які мають низку ключових спільних ознак – міжклітинна взаємодія, подібне мікрооточення тощо, – може виникати внаслідок метилування одних і тих самих генів. Тож у процесі пошуку епігенетичних маркерів на основі метилування генів враховують їхню специфічність до типу пухлини, що потребує порівняння їх із присутністю у інших пухлинах [10].

Аберантне метилування у кількох локусах було показане для раку сечового міхура, деякі з них були асоційовані зі стадією пухлини, прогнозом, прогресією, виникненням рецидивів і виживаністю пацієнтів [11]. Загалом було запропоновано кілька маркерних наборів, серед генів, які до них увійшли, є такі: *MYO3A*, *CA10*, *SOX11*, *NKX6-2*, *PENK*, *DBC1*, *DAPK*, *IRF8*, *p14*, *RASSF1A*, *SFRP1* [12], *GDF15*, *HSPA2*, *TMEFF2* і *VIM* [13].

Для успішності набору біомаркерів кожну комбінацію генів оцінюють за критеріями чутливості і специфічності. Було опубліковано кілька робіт, у яких запропоновані комбінації мали досить високу чутливість і специфічність, проте жодна з них досі не була визнана оптимальною [14].

Крім того, було показано, що існують популяційні відмінності у метилуванні різних генів для різних онкопатологій. Так, Chen зі співавторами провели дослідження кількох китайських субпопуляцій на наявність у хворих на рак сечового міхура метилування певного набору генів онкосупресорів, і виявили, що метилування генів *p14*, *IRF8*, *APC*, *hMLH1*, *SOCS-1* і E-кадгерину варіює серед різних субпопуляцій, а отже для кожної з них характерним є свій епігенотип для цього онкозахворювання [15].

У цій роботі ми зосередили свою увагу на трьох генах – *VIM*, *TMEFF2* і *GDF*, кожен з яких фігурував у комбінації з різними маркерами у різних авторів, а набір з усіх трьох генів показав високу чутливість і специфічність як маркери карциноми сечового міхура у дослідженні Costa зі співавторами [13].

Продукт гена *GDF15* (*MIC-1*) – фактор росту і диференціації 15 – належить до родини трансформувального фактороросту – бета (TGF-beta). Його експресію було виявлено у широкому

діапазоні різних типів клітин, проте в нормі він добре експресується у плаценті і в простаті, але не в більшості інших органів [16]. Підвищення рівня білка *GDF15* може бути асоційоване з деякими захворюваннями, наприклад, тканинною гіпоксією, запаленням, оксидативним стресом, оскільки цей цитокін залучений до клітинної програми відповіді на стрес унаслідок її враження і швидко індукується IL-1, TNF α , і TGF- β у макрофагах, обмежуючи їхню активацію і запальний процес. Онкосупресор p53 індукує експресію *GDF15*, який виконує функцію інгібітора росту в пухлинних клітинах. Порівняно з іншими мішенями p53 (наприклад p21/Waf-1) *GDF15* виділяється тим, що може діяти на сусідні клітини як екстраклітинний месенджер [16]. Для багатьох карцином характерне виявлення оверекспресії *GDF15*. Зокрема, підвищений рівень його характерний для раку молочної залози, товстого кишківника, щитоподібної залози і передміхурової залози [17]. Його значна оверекспресія в останньому випадку лягла в основу пропозицій використовувати цей білок як біомаркер для раку простати [18].

Ген *TMEFF2* кодує трансмембранний білок, який має два фолістатинові і один EGF-подібний домен. *TMEFF2* у нормі експресується у мозку і у передміхуровій залозі, а також у ембріоні на ранніх етапах індивідуального розвитку людини. Було показано, що одна з форм білка *TMEFF2* може індукувати фосфорилювання ERK1/2 і передавати клітині проліферативний сигнал. Зокрема, оверекспресія цього гена була показана при карциномі простати. Натомість для багатьох пухлин людини характерним є епігенетичне мовчання цього гена. Досліджуючи його експресію у тканинах пухлин раку шлунку і на клітинних лініях, Sun зі співавторами виявили, що порівняно з нормальною тканиною шлункового епітелію експресія гена *TMEFF2* у них значно знижена. Вони також показали, що оверекспресія *TMEFF2* у клітинних лініях раку шлунка AGS і MKN45 суттєво пригнічувала проліферацію пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*, а нокдаун *TMEFF2* значно підвищив проліферацію у клітинах GES-1, призвів до збільшення пошкоджень у ДНК і геномної нестабільності [19].

Ген *VIM* кодує білок віментин, член родини проміжних філаментів, і експресується переважно у сполучних тканинах. Разом з мікротрубочками і атиновими філаментами проміжні філаменти є основою цитоскелету. Було показано, що віментин залучений до багатьох біологічних процесів, зокрема він бере участь у підтримці сталої форми клітини, стабілізації

цитоскелетних взаємодій, у клітинній адгезії, міграції і сигналюванні [20]. Експресія гена *VIM* є класичним маркером мезенхімальних клітин, таких як фібробласти. Аберантне метилювання промотора *VIM* було показано для деяких видів раку, і частота його появи дала підставу пропонувати появу гіперметилюваних ділянок цього гена як маркер даних пухлин. Shirahata зі співавторами підтвердив наявність метилювання цього гена у колоректальних карциномах [21], а інша група дослідників виявила, що в первинних пухлинах прямої кишки промоторний регіон *VIM* є високометилюваним. Порівняно з нормальною тканиною рівень метилювання *VIM* був значно вищим у тканинах карцином сечового міхура. Costa зі співавторами на основі отриманих ним результатів висловив міркування, що метилювання *VIM* при раку сечового міхура можна детектувати у зразках сечі хворих [13; 22].

Спираючись на описане вище, можна припустити, що панель із трьох маркерів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF* може бути перспективною для ранньої, чутливої і специфічної діагностики раку сечового міхура. Оскільки гіперметилювання цих генів не було визнано характерним для раку нирки, а для раку передміхурової залози діагностичним вважають протилежний процес – оверекспресію двох генів із досліджуваного набору, то комбінація *VIM/TMEFF2/GDF* може виявляти добрі диференціальні властивості.

Проте, як було зазначено вище, епігенетичні зміни мають популяційні особливості, і дані, отримані на окремій популяції, не можуть однозначно поширюватись на інші. Оскільки на території України ще не проводили подібні дослідження для цієї онкопатології, метою нашої роботи було перевірити, чи детектуються заявлені потенційні епігенетичні маркери у сечі пацієнтів, хворих на рак сечового міхура, порівняно з сечею умовно здорових осіб в українській популяції і оцінити перспективу подальшого дослідження цього набору як маркерного.

Матеріали і методи

Забір клінічних зразків. Забір зразків проводили серед хворих із підтвердженим раком сечового міхура. По 50–100 мл сечі збирали перед операційним втручанням у пацієнтів відділення пластичної та реконструктивної онкоурології Національного інституту раку і третього урологічного відділення Інституту урології НАМН України. Вибірка для аналізу складала $n = 42$ хворих на рак сечового міхура на різних стадіях

Таблиця 1. Олігонуклеотидні праймери, використані для ПЛР у реальному часі

Назва гена	Тип праймера	Прямий праймер	Зворотний праймер
VIM	Зовн.*	5'-TATAAAAATAGCGTTTTCGGC-3'	5'-ATAACGCGAACTCCCG-3'
	Внутр.**	5'-TTCGGGAGTTAGTTCGCGTT-3'	5'-ACCGCCGAACATCCTACGA-3'
TMEFF2	Зовн.	5'-GAAGAGGGGCGTTAGTTC-3'	5'-ACGCTAACCCGAATAAACT-3'
	Внутр.	5'-GTTCGGGGTTACGCGC-3'	5'-TTCGCCTCACTCTCCGCT-3'
GDF15	Зовн.	5'-CGGCGGTTATTTGTATTTGC-3'	5'-AACGATCGTATCACGTCCC-3'
	Внутр.	5'-TCGGCGGTTATTTGTATTTGC-3'	5'-CACGACCTTAACGCCGTCG-3'

* – зовнішній, ** – внутрішній.

прогресії пухлини. Серед умовно здорових осіб було набрано зразки сечі у кількості $n = 5$.

Первинна обробка. Для преципітації циркулюючої ДНК із сечі використовували модифіковану методику, розроблену для преципітації олігонуклеотидів з розчину з використанням цетилметиламонію броміду (cetyltrimethylammonium bromide, СТАВ) [23]. У кожний зразок додавали СТАВ фінальною концентрацією 0,2 %.

Після цього інкубували у холодильнику (20–30 хв) до утворення видимого осаду і центрифугували на 2000 обертах. Відцентрифуговану сечу зливали, а осад, що залишився, розчиняли у лізувальному буфері з таким складом: додецилсульфат натрію (SDS) – 2 %, 10 мМ Tris (основа), 1,2 мМ ЕДТА, рН 8,0. Після цього переносили у пробірки ємністю 1,5 мл (по 400–500 мкл у пробірку) і додавали 10мкл протеїнази К. Інкубували з протеїназою К при температурі 56 °C протягом 1–2 годин.

Виділення ДНК. Проводили за стандартною методикою сумішню фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт (24:25:1). ДНК осаджували ізопропіловим спиртом у співвідношенні 1:1 у присутності ацетата натрію протягом 12 годин. Після цього центрифугували, промивали 70 % етиловим спиртом, висушували і розчиняли у ТЕ-буфері. Концентрацію ДНК оцінювали спектрофотометрично на спектрофотометрі NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Бісульфітна конверсія. Бісульфітну конверсію ДНК проводили за допомогою реагентів набору EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit (Zymo Research) згідно з протоколом виробника. Після очистки вимірювали концентрацію бісульфітно обробленої ДНК спектрофотометрично.

ПЛР у реальному часі. Для підвищення чутливості детекції метилювання генів інтересу використовували методику “nested” ПЛР. Послідовності зовнішніх і внутрішніх праймерів

наведено в табл. 1. Ампліфікацію проводили на Real-Time ампліфікаторі CFX96 (Biorad). Перший раунд складав 35 циклів, другий – 49 циклів. Умови: 95 °C – 10 хв; цикл: 95 °C – 15 с, 60–15 с, 72 °C – 15 с – 35 або 49 циклів; плавлення 65 °C – 0,05 с, 85 °C – 0,05 с.

Результати та обговорення

Результати дослідження метилювання трьох генів у сечі пацієнтів з діагностованою карциномною сечового міхура показали, що у більшості хворих, які потрапили у вибірку (69 %), дійсно детектується метилювання хоча б одного з них. У зразках умовно здорових людей жодного випадку метилювання кожного з досліджуваних генів виявлено не було (табл. 2).

Таблиця 2. Метилювання генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF* у вибірці хворих на рак сечового міхура та умовно здорових осіб

Показник статусу метилювання	Статус здоров'я піддослідних осіб	
	Хворі, кількість зразків	Здорові, кількість зразків
Наявне метилювання <i>VIM</i> , <i>TMEFF2</i> і <i>GDF</i>	29	0
Немає метилювання <i>VIM</i> , <i>TMEFF2</i> і <i>GDF</i>	13	5
Всього	42	5

Частота метилювання гена *VIM* у цій вибірці становила 0,643 (64,3 %), гена *TMEFF2* – 0,476 (47,6 %) і гена *GDF* – 0,357 (37,5 %).

Серед пацієнтів у 13 (31 %) було визначено метилювання усіх трьох генів-онкосупресорів. У чотирьох випадках визначалось метилювання генів *VIM* і *TMEFF2*, у двох – генів *TMEFF2* і *GDF*, проте в жодному не було виявлено одночасного метилювання тільки *VIM* і *GDF* (без *TMEFF2*). Загалом 2 із 3 генів були заметильовані у 6 пацієнтів. У 9 хворих було детектовано

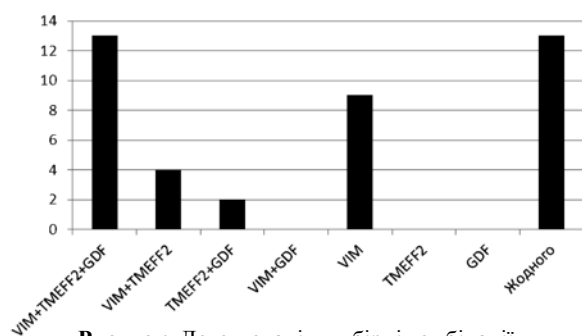


Рисунок. Детектовані у вибірці комбінації метилювання генів *VIM*, *TMEFF2*, *GDF*

метилювання тільки одного гена, і у всіх випадках це був ген, що кодує білок віментин (рисунок).

У 13 із 42 хворих не детектувалось метилювання жодного з генів інтересу.

Враховуючи отримані дані, ми зробили попередню оцінку чутливості і специфічності запропонованої панелі. Чутливість цієї комбінації маркерів становила 69 % (29/43), а специфічність – 100 % (5/5). Показники чутливості в нашому випадку суттєво розходяться з даними, отриманими Costa зі співавторами, які визначили чутливість такої панелі як 94 % (48/51). Специфічність у дослідженні згаданих авторів відповідала тій, що була виявлена у нашому дослідженні, і становила 100 % (20/20) [13]. Ця розбіжність може бути зумовлена як популяційними відмінностями у рівні метилювання, так і потребою перевірити цю панель на більшій вибірці.

Ми не виявили позитивної кореляції між стадією пухлини і рівнем метилювання генів із досліджуваного набору. Натомість усі 3 гени були замечильовані найчастіше у пацієнтів із пухлиною на першій стадії (T1). Їхня частка серед усіх пацієнтів з цією стадією розвитку пухлини становила 44,4 %, в той час як у пацієнтів із другою стадією раку сечового міхура *VIM*, *TMEFF2* і *GDF* були метильовані у 23 % випадків. Загалом *VIM* був замечильований у 63,7 % пацієнтів з пухлиною на першій стадії і у 73,3 % – у пацієнтів з другою стадією раку сечового міхура, *TMEFF2* – у 45,4 % і 40 %, *GDF* – у 45,4 % і 26,7 % відповідно. Порівняння першої та другої стадії подано у табл. 3.

Таблиця 3. Метилювання генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF* у пухлинах на стадіях T1 і T2

Гени, що замечильовані	Стадія пухлини, %	
	T1	T2
<i>VIM</i> + <i>TMEFF2</i> + <i>GDF</i>	36,4	20
<i>VIM</i> + <i>TMEFF2</i>	–	13,3
<i>TMEFF2</i> + <i>GDF</i>	9	6,7
<i>VIM</i>	27,3	40
Жодного	27,3	20

Випадки з T3 і T4 у цій вибірці були поодинокі (2 і 1 відповідно). У жодного з 2 пацієнтів із раком на третій стадії не було виявлено метилювання *VIM*, *TMEFF2* і *GDF*, а у пацієнта з четвертою стадією прогресії раку сечового міхура у сечі детектувалось метилювання гена *VIM*.

Costa зі співавторами, натомість, визначили, що у їхній вибірці була достовірною кореляція між рівнем метилювання досліджуваного набору генів і прогресією пухлини. Особливо вони відзначили *TMEFF2* як маркер, рівень метилювання якого достовірно підвищується з підвищенням стадії пухлини. Оцінюючи отримані результати, ми можемо відзначити ген *VIM*, який мав найвищу чутливість і був частіше замечильований у пацієнтів із другою стадією раку сечового міхура порівняно з першою.

Відсутність або низький рівень метилювання у досліджених зразках пацієнтів із раком сечового міхура на пізніших стадіях (T3 і T4) можна пояснити паралельним процесом деметилювання, який характерний для пухлинних клітин. Протягом прогресії, зі зростанням злоякісності пухлини її клітини змінюють свій фенотип, часто за рахунок епігенетичних механізмів. Було показано, що рівні метилювання в пухлинах на ранній і пізніших стадіях можуть відрізнятися як в один, так і в інший бік [24]. Наприклад, рак cervical cancer на пізній стадії має значно нижчий статус метилювання порівняно з нормальною тканиною або пухлинами на ранній стадії розвитку [25]. На сьогодні ще достеменно не відомо, що саме викликає появу рецидивів у пацієнтів, які проходили протипухлинну терапію від раку сечового міхура. Встановлено, що за своїми властивостями рецидивуючий рак може суттєво відрізнятися від первинного, мати інші властивості (зокрема, інвазивність) і локалізацію. Виникнення рецидиву зумовлюється великим набором гістопатологічних характеристик первинної пухлини, і оцінка ризику рецидивування досі є одним із невирішених завдань онкоурології [26].

Метилювання генів, які ми розглянули в цій роботі, було передбачене для ранньої діагностики пухлини, тому цілком імовірно, що вони можуть не виявляти належної чутливості за наявності рецидиву.

Висновки

Отже, можна зробити висновок, що метилювання генів *VIM*, *TMEFF2* і *GDF* дійсно детектується у сечі хворих на карциному сечового міхура в українській популяції. Наявність їх метилювання у більшій частині вибірки на фоні повної

відсутності такого в умовно здорових осіб дає право припустити, що подальше дослідження цієї комбінації генів як маркерної панелі є цілком доцільним. Проте для оцінки чутливості і специфічності цього набору маркерів слід розширити вибірку як хворих, так і умовно здорових людей, оскільки отримані результати не дають достовірних значень при застосуванні

методів статистичного аналізу, а практичне використання цього набору як маркерної панелі потребує високої статистичної достовірності. Крім того, для оцінки диференціувальної здатності визначення метилування *VIM*, *TMEFF2* і *GDF* ми нині перевіряємо ці потенційні маркери на вибірках хворих на карциному передміхурової залози і рак нирок.

Список літератури

1. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity / M. A. Knowles, C. D. Hurst // *Nature review. Cancer*. – 2015. – Vol. 15. – P. 25.
2. Vozianov O. F. Modern oncurology: achievements, problems, and outlooks / O. F. Vozianov, A. M. Romanenko, I. O. Klymenko // *Oncology*. – 2006. – Vol. 2. – P. 152–158.
3. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012 / J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, et al. // *European Journal of Cancer*. – 2013. – Vol. 49. – P. 1374–1403.
4. Detection of cancer-specific epigenomic changes in biofluids: Powerful tools in biomarker discovery and application / A. N. da Costa, Z. Herceg // *Molecular Oncology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 704–715.
5. Urinary Markers in Bladder Cancer / O. P. Vrooman, J. Alfred Witjes // *J european urology*. – 2008. – Vol. 53. – P. 909–916.
6. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation / Manel Esteller // *Hum. Mol. Genet*. – 2007. – Vol. 16 (R1). – P. 50–59.
7. Jones P. A. The fundamental role of epigenetic events in cancer / P. A. Jones, S. B. Baylin // *Nat. Rev. Genet*. – 2002. – Vol. 3. – P. 415–428.
8. DNA methylation and gene silencing in cancer / S. B. Baylin // *Nat. Clin. Pract. Oncol*. – 2005. – Suppl. 1. – P. 4–11.
9. Silencing of bidirectional promoters by DNA methylation in tumorigenesis / J. Shu, J. Jelinek, H. Chang, et al. // *Cancer Res*. – 2006. – Vol. 66. – P. 5077–5084.
10. Tissue-Specific Effects of Genetic and Epigenetic Variation on Gene Regulation and Splicing / M. Gutierrez-Arcelus, H. Ongen, T. Lappalainen, et al. // *PLoS Genet*. – 2015. – Vol. 11 (1).
11. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer / Y. K. Kim, W. J. Kim // *Int. J. Urol*. – 2009. – Vol. 16. – P. 17–22.
12. Methylation Markers for Urine-Based Detection of Bladder Cancer: The Next Generation of Urinary Markers for Diagnosis and Surveillance of Bladder Cancer / Thomas Reinert // *Advances in Urology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 1–11.
13. Three Epigenetic Biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, Accurately Predict Bladder Cancer from DNA-Based Analyses of Urine Samples / V. L. Costa, R. Henrique, A. Stine, et al. // *Clin Cancer Res*. – 2010. – Vol. 16. – P. 5842–5851.
14. Urinary markers for bladder cancer / Z. L. Smith, T. J. Guzzo // *F1000Prime Reports*. – 2013. – Vol. 5 (21). – P. 1–6.
15. Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine / P.-C. Chen, M.-H. Tsai, S. K. Yip, et al. // *BMC Med Genomics*. – 2011. – Vol. 4. – P. 45.
16. GDF15, a Cardioprotective TGF- β Superfamily Protein / T. Ago, J. Sadoshima // *Circulation Research*. – 2006. – Vol. 98. – P. 294–297.
17. Role of Macrophage Inhibitory Cytokine-1 in Tumorigenesis and Diagnosis of Cancer / A. R. Bauskin, D. A. Brown, T. Kuffner, et al. // *Cancer Res*. – 2006. – Vol. 66 (10). – P. 4983–4986.
18. Growth/differentiation factor-15: prostate cancer suppressor or promoter? / P. Váňhara, A. Hampl, A. Kozubík, et al. // *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. – 2012. – Vol. 15. – P. 320–328.
19. TMEFF2 Deregulation Contributes to Gastric Carcinogenesis and Indicates Poor Survival Outcome / T. Sun, W. Du, H. Xiong, et al. // *Clin Cancer Res*. – 2014. – Vol. 20. – P. 4689–4704.
20. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling / J. Ivaska, H. M. Pallari, J. Nevo, et al. // *Exp Cell Res*. – 2007. – Vol. 313 (10). – P. 2050–2062.
21. Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma / A. Shirahata, M. Sakata, K. Sakuraba, et al. // *Anticancer Res*. – 2009. – Vol. 29. – P. 279–281.
22. The Role of Vimentin as a Methylation Biomarker for Early Diagnosis of Cervical Cancer / S. Jung, L. Yi, J. Kim, et al. // *Mol Cells*. – 2011. – Vol. 31 (5). – P. 405–411.
23. Quantitative precipitation of short oligonucleotides with low concentrations of cetyltrimethylammonium bromide / J. P. Jost, J. Jiricny, H. Saluz // *Nucleic Acids Res*. – 1989. – Vol. 17 (5). – P. 2143.
24. DNA methylation in cancer: too much, but also too little / Melanie Ehrlich // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21, No. 35. – P. 5400–5413.
25. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma / Y. I. Kim, A. Giuliano, K. D. Hatch, et al. // *Cancer*. – 1994. – Vol. 74 (3). – P. 893–899.
26. Superficial Bladder Cancer: An Update on Etiology, Molecular Development, Classification, and Natural History / E. Pasin, D. Y. Josephson, A. P. Mitra, et al. // *Rev Urol*. – 2008. – Vol. 10 (1). – P. 31–43.

O. Mankovska, O. Skrypnikova, G. Panasenko, O. Kononenko, M. Vikarchuk, E. Stakhovskyy, V. Kashuba

DETECTION OF METHYLATION OF *VIM*, *TMEFF2* AND *GDF15* IN THE URINE OF PATIENTS WITH BLADDER CANCER IN UKRAINIAN POPULATION

Bladder cancer is one of the most common cancers in Ukraine and in the world, and the problem of its early diagnosis is still unresolved. The use of epigenetic markers, namely, the detection of tumor suppressor genes methylation, is a promising tool to assess the risks of the disease and its early detection, but it has a population features. The aim of this study was to test whether methylation of genes GDF15, TMEFF2 and VIM appears in the urine of patients with bladder cancer in the Ukrainian population, and evaluate the potential of this combination of methylated genes as tumor markers.

We collected urine from patients with bladder (sample size is $n = 42$) and used urine samples from 5 healthy people as negative control. DNA was precipitated by CTAB and isolated by using a standard phenol/chloroform/isopropanol approach. The presence of methylation of VIM, TMEFF2 and GDF15 promoters was detected by Real-Time MSP PCR after the procedure of DNA bisulfite conversion.

We found the presence of hypermethylation of all 3 genes among the studied patients ($n = 42$), while none was detected in samples taken from healthy people ($n = 5$). The sensitivity of this potential combination of markers was 69 %, with specificity of 100 %. Correspondence between tumor stage and presence or absence of any of the studied markers has not been identified. It was concluded that there is a necessity to increase the sample size and to test the capability of GDF15, TMEFF2 and VIM to distinguish between bladder cancer and other onco-urological diseases.

Keywords: methylation, tumor suppressor genes, bladder cancer, early diagnosis, tumor markers, GDF15, TMEFF2, VIM.

Матеріал надійшов 11.03.2016

УДК 582.929.4:[581.522.4+581.95]:543.061:543.621

Ковтун-Водяницька С. М.

МІНЕРАЛЬНИЙ СКЛАД СИРОВИНИ РОСЛИН РОДУ *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

У статті подано результати дослідження сировини інтродуцентів роду *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини Lamiaceae Lindl. Встановлено якісний склад і кількісний вміст мінеральних елементів у надземній частині рослин. Аналіз здійснено методом мас-спектрометрії з індукційно-зв'язаною плазмою (ІЗП-МС). Із 20 елементів, що визначали, ідентифіковано 6 – макро-, 7 – мікро- і 4 ультрамікроелементи. Важкі метали Cd, Pb, Ni не виявлено. Домінують елементи K, P, Mg, Fe, Cu.

Ключові слова: *Isodon*, елементний склад, мас-спектрометрія.

Вступ

Невід'ємною ланкою комплексних інтродукційних досліджень будь-якого виду рослин є біохімічна оцінка сировини, зокрема визначення мінерального складу. Кількісний і якісний мінеральний склад визначає потенційну цінність сировини конкретного виду рослин та її екологічну безпечність. Адже для забезпечення нормального функціонування систем живого організму елементи є незамінною складовою. Попри мінімізований вміст їх вплив на перебіг процесів і забезпечення життєдіяльності організму загалом є колосальним.

Нині в рослинах виявлено 71 хімічний елемент. Наявність того чи того елемента забезпечує нормальний розвиток рослини, зокрема,

С підтримує рівень окисно-відновного потенціалу клітини, входить до складу амінокислот, Na є активатором транспортних систем клітини рослини, K – активує понад 60 ферментів, сприяє гідратації протоплазми, відіграє роль у транспортуванні іонів, водному обміні і осморегуляції, Fe бере участь у функціонуванні основних редокс-систем фотосинтезу та дихання, входить до складу цитохромів, каталази, металоціанінових комплексів, Mg – є складовою хлорофілу, впливає на включення дезоксирибонуклеотидів у молекулу ДНК, тощо [1; 2].

Для людини, як споживача рослинної сировини, величезне значення має здатність рослин накопичувати окремі елементи, а також можливість їхнього кількісного переходу безпосередньо до