

Т.В. Задворний¹,
Н.Ю. Лук'янова¹,
Т.В. Борікун¹,
О.В. Кашуба¹,
Е.О. Стаховський²,
Ю.В. Вітрук²,
А.В. Тимошенко¹,
О.М. Мушій¹,
Л.М. Ковалевська¹,
В.Ф. Чехун¹

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Україна

² Національний інститут раку МОЗ України, Київ, Україна

Ключові слова: рак передміхурової залози, доброякісна гіперплазія передміхурової залози, остеопонтин, остеонектин, SPP1, SPARC

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.047>

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ МАТРИЦЕЛЮЛЯРНИХ ГЕНІВ (ОСТЕОПОНТИНУ ТА ОСТЕОНЕКТИНУ) У ДОБРОЯКІСНИХ ТА ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕННЯХ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Рак передміхурової залози (РПЗ) є однією із найпоширеніших онкопатологій у чоловіків як в Україні, так і у світі, що визначає необхідність пошуку нових діагностичних та прогностичних маркерів. Згідно даних сучасної літератури, характерною ознакою злоякісного росту та прогресії є ремоделювання екстрацелюлярного матриксу на фоні зростання експресії матрицелюлярних протеїнів (MCP). **Мета роботи:** провести порівняльне дослідження експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК (SPP1 та SPARC) та білка (остеопонтин (OPN) та остеонектин (ON)) у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози. **Об'єкт і методи:** робота базується на аналізі результатів обстеження та лікування 50 хворих на РПЗ II–III стадії та 20 хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози (ДГПЗ), що проходили лікування протягом 2015–2021 рр. у Національному інституті раку МОЗ України. Дослідження експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК та білка у тканині РПЗ і ДГПЗ проведене зі застосуванням методів полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та імуногістохімії, відповідно. Дослідження показників експресії SPP1 та SPARC у тканині ДГПЗ та РПЗ проведено за допомогою ресурсу samAPP із використанням Cambridge Dataset (2015). Аналіз показників безрецидивної виживаності хворих на РПЗ залежно від експресії SPP1 та SPARC проведено за допомогою ресурсу PROGeneV2 із використанням GSE40272 Dataset. Статистичний аналіз проводили за допомогою GraphPad Prism v. 8.00. **Результати:** аналіз результатів імуногістохімічного дослідження MCP встановив, що тканина РПЗ характеризується високим рівнем OPN та ON. Продемонстровано, що рівень експресії ON у тканині РПЗ у 2,5 раза ($p < 0,05$) вище порівняно із тканиною ДГПЗ. Виявлено, що рівень SPP1 та SPARC у тканині РПЗ був у 3,9 ($p < 0,05$) та у 28,9 ($p < 0,05$) разів більшим порівняно із відповідними показниками експресії зазначених генів у тканині ДГПЗ. Показано, зниження показників безрецидивної 5-річної виживаності на 20,0% ($p < 0,05$) у хворих на РПЗ із високим рівнем мРНК SPARC у пухлинній тканині. **Висновки:** отримані результати свідчать про необхідність подальшого вивчення ролі генів MCP у механізмах розвитку РПЗ з метою використання цих показників в якості маркерів диференційної діагностики пухлинного процесу.

Накопичені в останні десятиліття дані дозволяють розглядати екстрацелюлярний матрикс (extracellular matrix, ECM) не просто як статичний каркас для фізичної організації клітин, а і як критично важливу нішу, що бере участь у регуляції процесів проліферації, міграції та клітинної загибелі. З огляду на це, ECM є ключовим фактором таких фізіологічних процесів, як розвиток, гомеостаз і ремоделювання тканин [1]. Сьогодні, білковий компонент ECM можна розділити на дві групи залежно від основних функцій протеїнів: структурні або адгезивні білки і матрицелюлярні протеїни

(matricellular proteins, MCP) [2]. MCP являють собою групу глікопротеїнів, асоційованих з ECM, які секретуються пухлинними та стромальними клітинами. Цікавою особливістю MCP є те, що їх функції можуть змінюватися залежно від гістогенезу тканини та динамічних умов, які супроводжують гомеостатичні або репараційні процеси [3].

Відомо, що MCP виконують регуляторну роль, таку як модуляція взаємодій клітина–клітина та клітина–матрикс, але не роблять істотного внеску в саму структуру ECM [2, 4, 5]. Ці білки здатні впливати на виживаність злоякісно трансформованих клітин.

ваних клітин, індукувати їх проліферацію, міграцію та інвазію, а також сприяти набуттю резистентності до терапії. Окрім прямого впливу на пухлинні клітини, МСР відіграють ключову роль у ангіогенезі, імуномодуляції, інфільтрації та проліферації стромальних клітин, та ремоделюванні ЕСМ [5].

Встановлено, що характерною ознакою ремоделювання ЕСМ, у тому числі під час канцерогенезу, є зростання експресії МСР. Пухлинні клітини та навколишні активовані стромальні клітини є основними типами клітин, які аномально секретують МСР у мікрооточення пухлини, сприяючи, таким чином, злоякісному росту [2, 6]. Високі рівні експресії МСР, зокрема представників родин тенасцину, CCN, SIBLING та SPARC, асоціюються із агресивним перебігом пухлинного процесу [5]. Варто зауважити, що у деяких дослідженнях продемонстровано також і онкосупресорні властивості окремих МСР [4, 7, 8].

Представлені в літературі дані свідчать про важливу роль у прогресії раку передміхурової залози (РПЗ) таких МСР як остеопонтин (*osteopontin*, OPN) та остеонектин (*osteonectin*, ON) [9–15]. OPN є одним із основних білків кісткового матриксу, що широко поширений в органах і тканинах та відіграє важливу роль у стимулюванні запалення. Як цитокін, гомологічний матриксним білкам, OPN відіграє вирішальне значення у регуляції адгезії між клітинами та позаклітинним матриксом, мінералізації та реконструкції кісток, клітинної міграції та рухливості. OPN також може сприяти проліферації та диференціюванню клітин, виживаності та інвазії [16]. Що стосується ON, то цей білок відомий своїми онкогенними та онкосупресорними властивостями, бере участь у формуванні позаклітинного матриксу та мінералізації кістки. ON відіграє важливу роль у ремоделюванні тканин, підтримці цілісності клітинного матриксу та взаємодії при збиранні колагенових волокон. Також відомо, що ON секретується стромальними та пухлинними клітинами, впливає на ріст новоутворень регулюючи клітинну проліферацію, адгезію, міграцію, інвазію та ангіогенез [17]. Незважаючи на велику кількість публікацій присвячених цим двом представникам родини МСР, досі відсутній єдиний погляд на роль OPN та ON у виникненні та прогресії РПЗ [17–21].

Враховуючи зазначене, метою нашої роботи було провести порівняльне дослідження експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК (*SPPI* та *SPARC*) та білка (OPN та ON) у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота базується на аналізі результатів обстеження та лікування 50 хворих на РПЗ II–III стадії

та 20 хворих на доброякісну гіперплазію передміхурової залози (ДГПЗ), що проходили лікування протягом 2015–2021 рр. у Національному інституті раку МОЗ України і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях. Вік хворих на РПЗ коливався від 45 до 80 років, середній вік — $63,0 \pm 5,8$ роки. Середній вік хворих на ДГПЗ складав $69,1 \pm 7,8$ років, у 50% досліджених випадків об'єм передміхурової залози не перевищував 120 см^3 .

Пацієнтів обстежено згідно зі стандартами діагностики та лікування хворих, затверджених наказами МОЗ України. Клінічний діагноз встановлювали на підставі визначення рівня простатспецифічного антигену (ПСА) у сироватці крові, пальцевого ректального дослідження, комп'ютерної томографії органів малого тазу і/або трансректального ультразвукового дослідження передміхурової залози та органів черевної порожнини, остеосцинтиграфії, рентгенографії органів грудної порожнини. У всіх пацієнтів діагноз було верифіковано після проведення трансректальної мультифокальної біопсії передміхурової залози під ультразвуковим контролем. Неoad'ювантну терапію хворим на РПЗ не проводили. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародною класифікацією пухлин (TNM, 7 та 8 видання, 2009, 2016). Гістологічний тип новоутворень верифікували при морфологічному дослідженні гістологічних зрізів парафінових блоків пухлин (фарбування зрізів гематоксиліном та еозином) відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації ВООЗ (2006).

Метод морфологічного дослідження тканини доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози. Для морфологічного дослідження операційний матеріал видалених пухлин фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну та здійснювали подальшу обробку із дотриманням загальноприйнятих принципів гістологічної техніки. З парафінових блоків операційного матеріалу готували зрізи товщиною 5 мкм, які фарбували гематоксиліном та еозином і за допомогою світлооптичної мікроскопії вивчали морфологічні особливості будови пухлин.

Метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Для дослідження експресії мРНК матрицелюлярних генів у тканині РПЗ та ДГПЗ було застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі [47]. Тотальну РНК з тканини РПЗ та ДГПЗ залитої у парафінових блоках виділяли за допомогою комерційного набору “RNeasy FFPE Kit” (QIAGEN, Німеччина) згідно з протоколом виробника. Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (ThermoScientific, США). Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного по-

глинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у трис-ЕДТА буфері та до проведення ПЛР зберігали при -20°C .

Для вивчення експресії мРНК *SPP1* та *SPARC* ДНК синтезували з 100нг загальної РНК з використанням набору LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Inc., США) для зворотної транскрипції. В якості ендogenous контролю для визначення експресії мРНК використовували мРНК β -актину (*ACTB*).

Для ПЛР в реальному часі використовували праймери, отримані за допомогою ресурсу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> та синтезовані компанією Metabion, Німеччина (табл. 1)

Послідовності праймерів, для зворотно-транскрипційної ПЛР (ЗТ–ПЛР) та ПЛР в реальному часі були визначені за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/мікроРНКnadesigntool/> та синтезовані компанією Metabion, Німеччина. ЗТ–ПЛР проводили в ампліфікаторі QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System (ThermoScientific, USA). ПЛР у реальному часі для визначення рів-

нів мРНК *SPP1* та *SPARC* проводили за заданими умовами (табл. 2, 3).

Відносна експресія досліджуваних мРНК *SPP1* та *SPARC* була визначена порівняльним Ct методом. Різницю фолду (*Fold change, fold difference*) між експресією досліджуваних мРНК обчислювали за формулами $2^{-\Delta\text{Ct}}$ (далі — у.о.). Похибки для розрахунків різниці фолду показують діапазон значень ΔCt , оснований на включенні стандартного відхилення в ці значення [22].

Імуногістохімічний метод. Дослідження експресії МСР у пухлинних клітинах проводили на парафінових зрізах товщиною 5 мікрметрів. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла специфічні до OPN (clone 441; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) та ON (clone ON1–1; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Для візуалізації результатів реакції використовували набір реактивів Mouse/Rabbit PolyVue Plus HRP/DAB Detection System, (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) відповідно до рекомендацій виробника, зрізи забарвлювали гематоксиліном

Таблиця 1

Послідовності праймерів для визначення експресії мРНК *SPP1* та *SPARC*

Ген	Праймер	
<i>ACTB</i>	Forward	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'
	Reverse	5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAA-3'
<i>SPP1</i>	Forward	5'-CGAGGTGATAGTGTGGTTATGG-3'
	Reverse	5'-GCACCATTCAACTCCTCGCTTTC-3'
<i>SPARC</i>	Forward	5'-TGCCTGATGAGACAGAGGTGGT-3'
	Reverse	5'-CTTCGGTTTCCTCTGCACCATC-3'

Таблиця 2

Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент реакційної суміші	Кількість на 20 мкл реакційної суміші
2х-універсальна суміш LUNA® qPCR Master Mix (2X), New England Biolabs, Inc., США	10,00
Вода, очищена від нуклеаз	4,00
20х суміш forward та reverse праймерів для мікроРНК	1,00
кДНК	5,00
Всього	20,00

Таблиця 3

Умови проведення ПЛР (кількість зразка — 20 мкл)

Крок	Активція полімерази	Полімеразна ланцюгова реакція	
	HOLD	Цикл (40 циклів)	
		Денатурація	Подовження ланцюга
Час	10 хв	15 с	60 с
Температура ($^{\circ}\text{C}$)	95	95	60

Meera (Thermo Scientific Richard-Allan, Kalamazoo, Michigan, USA).

Аналіз результатів імуногістохімічних досліджень проводили використовуючи методику підрахунку імунопозитивних клітин з використанням світлового мікроскопу Primo Star (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), зі збільшенням $\times 400$. Щоб оцінити експресію досліджуваних молекул напівкількісно, при імуногістохімічних дослідженнях використовували метод H-Score зі застосуванням формули:

$$S = 0 \times N_0 (\%) + 1 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 3 \times N_3 (\%),$$

де S — показник “H-Score”; N_0 — кількість клітин з відсутньою експресією; N_1 , N_2 та N_3 — з низькою, середньою та високою експресією, відповідно.

Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів — низький, від 101 до 200 — середній, від 201 до 300 — високий рівень експресії [23].

Аналіз відкритих баз даних. Дослідження показників експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози проведено за допомогою ресурсу samcAPP (<https://bioinformatics.cruk.cam.ac.uk/apps/samcAPP/>) із використанням Cambridge Dataset (2015). Аналіз показників безрецидивної виживаності хворих на РПЗ залежно від експресії матрицелюлярних генів проведено за допомогою ресурсу PROGgeneV2 — Pan Cancer Prognostics Database (<http://www.progtools.net/gene/>) із використанням GSE40272 Dataset.

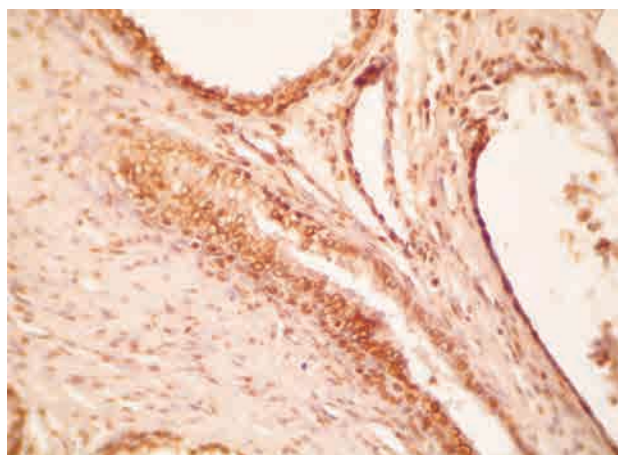
Статистичний аналіз виконували з використанням пакета програмного забезпечення GraphPad Prism v. 8.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). З метою порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою використовували U-критерій Манн—Уїтні. Для графічного представлення

результатів дослідження застосовувалися квартильні діаграми (“boxplot”), у яких центральною лінією позначалася медіана, нижнім і верхнім обмежувачами “ящика” — відповідно перший і третій квартилі. Вуса, що виходять із прямокутників, вказують мінімальне та максимальне значення показників в досліджуваних групах. Статистично достовірною вважали різницю між показниками груп за $p < 0,05$.

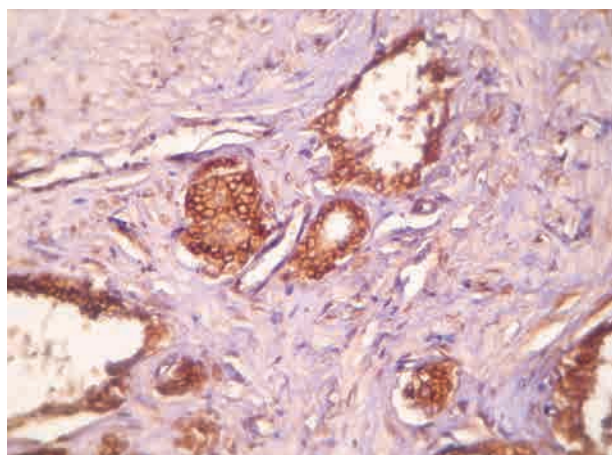
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження показав значну варіабельність розташування клітин, які експресували OPN та ON у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози. Позитивна реакція з антитілами до OPN та ON визначалась у вигляді коричневого забарвлення цитоплазми або ЕСМ різного ступеня інтенсивності (від світло- до темно-коричневого). Звертає на себе увагу той факт, що експресія OPN в окремих випадках детектувалась в ядрах клітин РПЗ. Експресія OPN також визначалась і в інтра-люмінальному секреті передміхурової залози, та у *corpora amylacea*. У той же час експресія ON локалізувалась виключно в цитоплазмі пухлинних клітин передміхурової залози. Крім того сильна імунопозитивна реакція з антитілами до ON спостерігалась у стромальному компоненті новоутворень, зокрема у фібробластах та макрофагах (рис. 1, 2).

Аналіз кількісних показників експресії OPN та ON у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози встановив, що тканина РПЗ характеризується високим рівнем обох досліджуваних МСР. При цьому продемонстровано, що рівень експресії ON у тканині РПЗ в 2,5 раза ($p < 0,05$) вище порівняно із тканиною ДГПЗ. Достовірної різниці кількісних показників експресії OPN у тканині ДГПЗ та РПЗ не виявлено (рис. 3 А).



А



Б

Рис. 1. Експресія OPN в тканині ДГПЗ (А) та РПЗ (Б). Імуногістохімічний метод, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлориду. Забарвлення гематоксиліном, $\times 200$

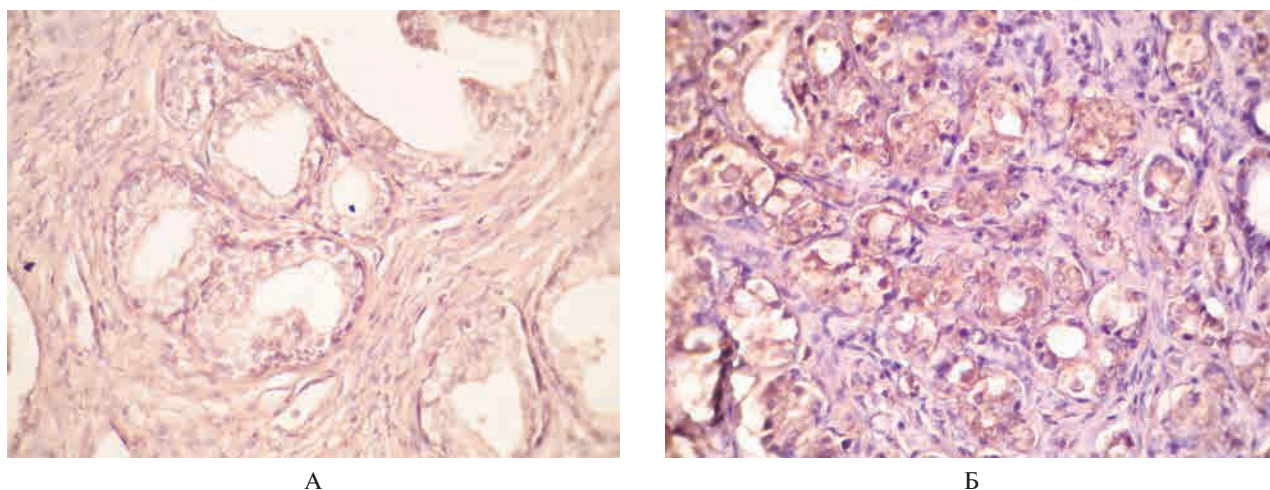


Рис. 2. Експресія ON в тканині ДГПЗ (А) та РПЗ (Б). Імуногістохімічний метод, хромоген 3-діамінобензидин тетрагидрохлориду. Забарвлення гематоксилином, $\times 400$

Порівняльне дослідження показників експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК дозволило визначити, що рівень *SPPI* та *SPARC* в тканині РПЗ був у 3,9 ($p < 0,05$) та у 28,9 ($p < 0,05$) разів більшим порівняно із відповідними показниками експресії зазначених генів у тканині ДГПЗ (рис. 3 Б).

У подальшому за доцільне вважали провести аналіз відкритих баз даних щодо рівнів експресії матрицелюлярних генів у тканині хворих на доброякісні та злоякісні новоутворення передміхурової залози. Згідно даних отриманих за допомогою ресурсу samcAPP із використанням Cambridge Dataset (2015) встановлено, що тканина РПЗ характеризується достовірно більшою експресією мРНК *SPPI* ($p = 5.1559 \times 10^{-11}$) та достовірно меншим рівнем мРНК *SPARC* ($p = 0.01$) порівняно із аналогічними показниками у тканині ДГПЗ (рис. 4). Варто також зазначити, що у хворих на кастраційно-резистентний РПЗ рівень мРНК *SPPI* та *SPARC* був значно вищий порівняно як з тканиною гормон-чутливого РПЗ, так і з тканиною ДГПЗ.

Аналіз виживаності хворих залежно від показників експресії матрицелюлярних генів, проведений за допомогою ресурсу PROGeneV2, дозволив з'ясувати, що рівень експресії *SPARC* може бути використаний в якості прогностичного маркера у хворих на РПЗ. Як видно з даних наведених на рис. 5, достовірне зниження показників безрецидивної 5-річної виживаності майже на 20,0% встановлено у хворих на РПЗ із високим рівнем мРНК *SPARC* у пухлинній тканині (рис. 5 Б). Зв'язку між показниками безрецидивної виживаності хворих на РПЗ та рівнем мРНК *SPPI* не виявлено (рис. 5 А).

Таким чином, отримані дані вказують на варіабельність якісних та кількісних показників експресії матрицелюлярних генів у тканині ДГПЗ і РПЗ та свідчать, що характерною ознакою РПЗ є високий рівень мРНК *SPPI* і *SPARC*, а також підвищення експресії ON у пухлинних клітинах. Діагностичне значення порушень експресії матрицелюлярних генів за розвитку доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози остаточно не з'ясовано. Існують повідомлення про достовірно вищі рівні експресії OPN у тканині

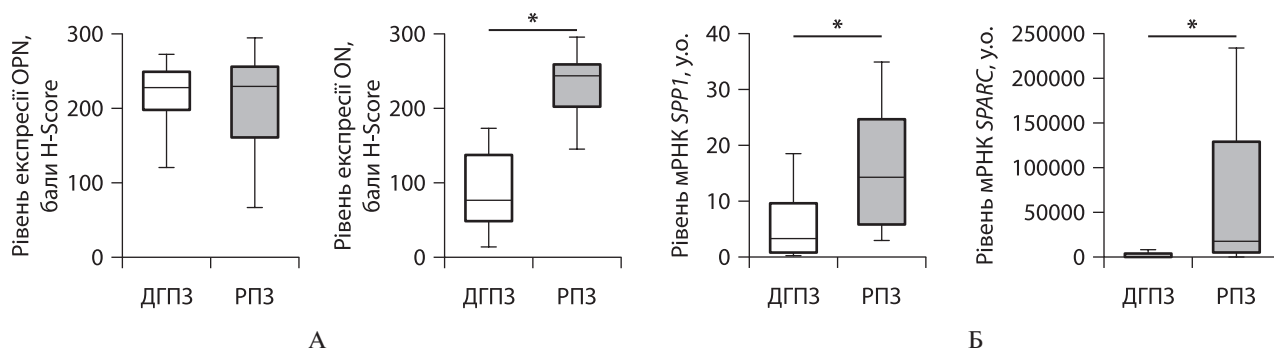


Рис. 3. Експресія матрицелюлярних генів на рівні білка (А) та мРНК (Б) в тканині доброякісних та злоякісних новоутворень передміхурової залози. * — $p < 0,05$ — різниця у порівнянні із групою хворих на ДГПЗ статистично підтверджена

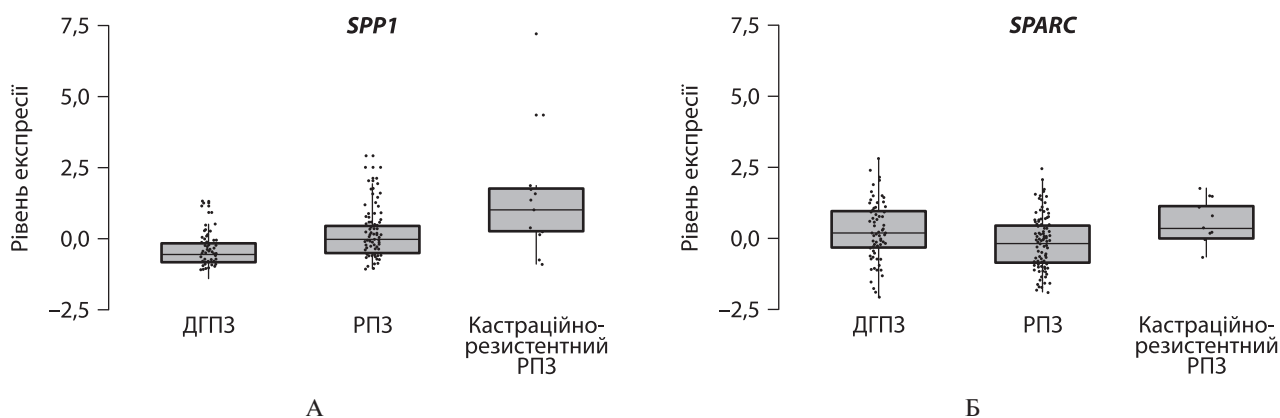


Рис. 4. Показники експресії *SPP1* та *SPARC* у тканині новоутворень передміхурової залози відповідно до даних samсAPP

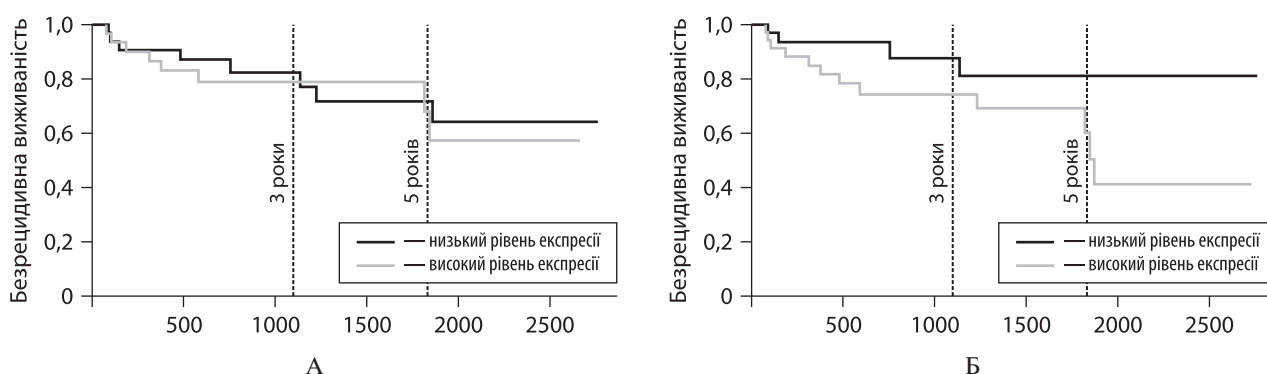


Рис. 5. Показники безрецидивної виживаності хворих на РПЗ залежно від показників експресії *SPP1* та *SPARC* у тканині новоутворень відповідно до даних PROGeneV2

ДГПЗ порівняно із немалігнізованою тканиною передміхурової залози [21, 24]. Крім того, відзначається, що тканина РПЗ характеризується значно більшими показниками МСР у порівнянні як із тканиною ДГПЗ, так і нормальною тканиною передміхурової залози [25, 26]. У той же час, у деяких дослідженнях відмічається відсутність різниці між рівнем експресії *OPN* у нормальній та пухлинній тканинах передміхурової залози [26]. Що стосується *ON*, виявлено, що його високі рівні характерні для метастатичного РПЗ, тоді як у немалігнізованій тканині та у тканині доброякісних новоутворень передміхурової залози експресія цього протеїну навпаки низька [27]. На противагу цьому, інші дослідники продемонстрували, що тканина РПЗ характеризується низьким рівнем експресії *ON* у порівнянні з нормальною тканиною передміхурової залози та тканиною ДГПЗ [28]

Окремої уваги потребують отримані нами дані щодо особливостей локалізації МСР у тканині злоякісних новоутворень передміхурової залози. Зокрема, релокалізація експресії *OPN* з цитоплазми у ядро клітин свідчить про порушення його регуляції, у той час як детекція *ON* у стромальному компоненті пухлинного вогнища є підтверджен-

ням значення ЕСМ у розвитку гормонозалежних новоутворень.

Отже, отримані нами результати свідчать про доцільність подальшого вивчення ролі генів МСР у механізмах розвитку РПЗ з метою використання цих показників в якості маркерів диференційної діагностики пухлинного процесу.

Робота виконувалася в рамках НДР “Створення панелей пухлинно-асоційованих біомаркерів для ранньої діагностики та прогнозування перебігу раку передміхурової залози” (№ держреєстрації 0122U001976) та “Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень” (№ держреєстрації 0118U005468).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Gordon-Weeks A, Yuzhalin AE. Cancer extracellular matrix proteins regulate tumour immunity. *Cancers* 2020; **12** (11): 3331. doi: 10.3390/cancers12113331
2. Gopinath P, Natarajan A, Sathyanarayanan A, et al. The multifaceted role of Matricellular Proteins in health and cancer, as biomarkers and therapeutic targets. *Gene* 2022; **815**: 146137. doi: 10.1016/j.gene.2021.146137
3. Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and me-

- tastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2010; **29**: 295–307. doi: 10.1007/s10555-010-9221-8
4. Gerarduzzi C, Hartmann U, Leask A, *et al.* The matrix revolution: matricellular proteins and restructuring of the cancer microenvironment. *Cancer Res* 2020; **80** (13): 2705–17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2098
 5. Thakur R, Mishra DP. Matrix reloaded: CCN, tenascin and SIBLING group of matricellular proteins in orchestrating cancer hallmark capabilities. *Pharmacol Ther* 2016; **168**: 61–74. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.09.002
 6. Sodek J, Zhu B, Huynh MH, *et al.* Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* 2002; **43** (2–3): 308–19. doi: 10.1080/03008200290001050
 7. Vilorio K, Hill NJ. Embracing the complexity of matricellular proteins: the functional and clinical significance of splice variation. *Biomol Concepts* 2016; **7** (2): 117–32. doi: 10.1515/bmc-2016-0004
 8. Wu T, Ouyang G. Matricellular proteins: multifaceted extracellular regulators in tumor dormancy. *Protein Cell* 2014; **5** (4): 249–52. doi: 10.1007/s13238-014-0023-6
 9. Desai B, Rogers MJ, Chellaiah MA. Mechanisms of osteopontin and CD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2007; **6**: 1–16. doi: 10.1186/1476-4598-6-18
 10. Al-Wadi AH, Al-A'araji SB, Ali SJ, *et al.* Evaluation of serum osteopontin and its relation with other biomarkers of prostate cancer in Iraqi patients. *AIP Conference Proceedings* 2022; **2450** (1): 020015. doi: 10.1063/5.0095584
 11. Moorman HR, Poschel D, Klement JD, *et al.* Osteopontin: a key regulator of tumor progression and immunomodulation. *Cancers* 2020; **12** (11): 3379. doi: 10.3390/cancers12113379
 12. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol* 2014; **37**: 131–41. doi: 10.1016/j.matbio.2014.03.001
 13. Trotter TN, Yang Y. Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone. *Matrix Biol* 2016; **52**: 301–14. doi: 10.1016/j.matbio.2016.01.006
 14. Mateo F, Meca-Cortés Ó, Celià-Terrassa T, *et al.* SPARC mediates metastatic cooperation between CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. *Mol Cancer* 2014; **13**: 1–17. doi: 10.1186/1476-4598-13-237
 15. Jacob K, Webber M, Benayahu D, *et al.* Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 1999; **59** (17): 4453–7. PMID: 10485497
 16. Yu A, Guo K, Qin Q, *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of osteopontin expression in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep* 2021; **41** (8): BSR20203531. doi: 10.1042/BSR20203531
 17. Sharma S, Xing F, Liu Y, *et al.* Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) mediates metastatic dormancy of prostate cancer in bone. *J Biol Chem* 2016; **291** (37): 19351–63. doi: 10.1074/jbc.M116.737379
 18. Said N, Frierson HF, Chernauskas D, *et al.* The role of SPARC in the TRAMP model of prostate carcinogenesis and progression. *Oncogene* 2009; **28** (39): 3487–98. doi: 10.1038/onc.2009.205
 19. Sharma S, Xing F, Liu Y, *et al.* SPARC in tumor micro-environment induces dormancy of prostate cancer in bone. *Cancer Res* 2015; **75**: 3206. doi: 10.1158/1538-7445.AM2015-3206
 20. Nakamura KDM, Tilli TM, Wanderley JL, *et al.* Osteopontin splice variants expression is involved on docetaxel resistance in PC3 prostate cancer cells. *Tumor Biol* 2016; **37**: 2655–63. doi: 10.1007/s13277-015-4095-6
 21. Popovics P, Awadallah WN, Kohrt SE, *et al.* Prostatic osteopontin expression is associated with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* 2020; **80** (10): 731–41. doi: 10.1002/pros.23986
 22. Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R. 2013. ddCt method for qRT-PCR data analysis. <https://citeseerx.ist.psu.edu/pdf/63727bfe6cc3467c2a02e0816e6451ef242b481b>
 23. McClelland RA, Wilson D, Leake R, *et al.* A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification. *British Quality Control Group. Eur J Cancer* 1991; **27** (6): 711–5. doi: 10.1016/0277-5379(91)90171-9
 24. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, *et al.* Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999; **5** (8): 2271–77. PMID: 10473115
 25. Tilli TM, Thuler LC, Matos AR, *et al.* Expression analysis of osteopontin mRNA splice variants in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Exp Mol Pathol* 2012; **92** (1): 13–9. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.09.014
 26. Forootan SS, Foster CS, Aachi VR, *et al.* Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. *Int J Cancer* 2006; **118** (9): 2255–61. doi: 10.1002/ijc.21619
 27. Thomas S, Waterman P, Chen S, *et al.* Development of secreted protein and acidic and rich in cysteine (SPARC) targeted nanoparticles for the prognostic molecular imaging of metastatic prostate cancer. *J Nanomed Nanotechnol* 2011; **2** (112): 2157-7439-2-112. doi: 10.4172/2157-7439.1000112
 28. Danasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer metastasis. *Nature* 2001; **412** (6849): 822–6. doi: 10.1038/35090585

FEATURES OF THE EXPRESSION OF MATRICELLULAR GENES (OSTEOPONTIN AND OSTEONECTIN) IN BENIGN AND MALIGNANT TUMORS OF THE PROSTATIC GLAND

T. Zadvorny¹, N. Lukianova¹, T. Borikun¹, O. Kashuba¹, E. Stakhovsky², Yu. Vitruk², A. Tymoshenko¹, O. Mushii¹, L. Kovalevska¹, V. Chekhun¹

¹ RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine

² National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

Summary. Prostate cancer (PCa) is one of the most common oncological diseases in men both in Ukraine and in the world, which determines the need to search for new diagnostic and prognostic markers. According to the data of modern literature, a characteristic feature of malignant growth and progression is the remodeling of the extracellular matrix on the background of an increase in the expression of matricellular proteins (MCP). **Aim:** to conduct a comparative study of the expression of matricellular genes at the level of mRNA (SPP1 and SPARC) and protein (OPN and ON) in the tissue of benign and malignant tumors of the prostate gland. **Objects**

and methods: the work is based on the analysis of the results of examination and treatment of 50 patients with stage II–III prostate cancer and 20 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), who were treated during 2015–2021 at the National Cancer Institute of the Ministry of Health of Ukraine. The study of the expression of matricellular genes at the level of mRNA and protein in the PCa and BPH tissues was carried out using the methods of real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry, respectively. The bioinformatical study of SPP1 and SPARC expression in the tissue of BPH and PCa was carried out using the camcAPP resource on the Cambridge Dataset (2015). The analysis of the recurrence-free survival rates of patients with PCa depending on the expression of SPP1 and SPARC was carried out using the PROGeneV2 (GSE40272 Dataset). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v. 8.00. **Results:** the analysis of the results of the immunohistochemical study of the MCP established that the PCa tissue is characterized by a high level of OPN and ON. It has been demonstrated that the level of ON expression in the PCa tissue is 2.5 ($p < 0.05$) times higher compared to BPH tissue. It was found that the level of SPP1 and SPARC in the PCa tissue was 3.9 ($p < 0.05$) and 28.9

($p < 0.05$) times higher compared to the corresponding expression indicators of the studied genes in the tissue of the BPH. It is shown that the rate of recurrence-free 5-year survival decreased by 20.0% ($p < 0.05$) in patients with PCa with a high level of SPARC mRNA in the tumor tissue. **Conclusions:** the obtained results indicate the need for further study of the role of MCP genes in the mechanisms of the development of PCa with the aim of using these indicators as markers for the differential diagnosis of the tumor process.

Key words: prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, osteopontin, osteonectin, SPP1, SPARC

Адреса для листування:

Задворний Т.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: tito132007@ukr.net

Одержано: 25.04.2023