

DOI: 10.26693/jmbs06.06.093

УДК 616.6-006:577.213/.216

Волкогон А. Д., Гарбузова В. Ю., Атаман О. В.

АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗКУ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ rs4977574 ГЕНА ДОВГОЇ НЕКОДУЮЧОЇ РНК *ANRIL* ІЗ ВИНИКНЕННЯМ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ

Сумський державний університет, Україна

Метою даної роботи стало дослідження можливого зв'язку rs4977574-поліморфізму гена днкРНК *ANRIL* із виникненням раку передміхурової залози серед чоловіків української популяції.

Матеріал та методи. До дослідження було загалом залучено 250 осіб чоловічої статі. Із них до складу дослідної групи увійшло 184 хворих із раком передміхурової залози, а до складу контролю – 66 чоловіків без злоякісних пухлин в анамнезі. Генотипування за rs4977574-локусом гена *ANRIL* реалізували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-time PCR). Реакція проводилась на приладі Quant Studio 5 DX Real-Time («Applied Biosystems», США) у присутності TaqMan assays (TaqMan@SNP Assay C_31720978_30).

Результати. Останні експериментальні дослідження продемонстрували причетність довгої некодуєчої РНК *ANRIL* до розвитку злоякісних пухлин різної локалізації. При цьому практично відсутні відомості щодо ролі поліморфізму гену цієї РНК у виникненні раку передміхурової залози. Питання ймовірної асоціації генетичного поліморфізму *ANRIL* із ризиком настання раку передміхурової залози в українській популяції зовсім не розкриті.

У результаті проведеного генотипування було виявлено, що загалом чоловіки контролю та пацієнти із раком передміхурової залози достовірно не відрізнялись за частотою rs4977574-генотипів ($p = 0,886$). Не було встановлено достовірної різниці і під час відповідного порівняння окремо серед осіб із нормальною вагою, надмірною вагою, без та зі звичкою курити ($p > 0,05$). Аналіз зв'язку різних генотипів за rs4977574-сайтом гена *ANRIL* із ризиком настання раку передміхурової залози за допомогою логістичної регресії також не показав достовірного зв'язку у рамках різних моделей успадкування як до, так і після поправки на вік, індекс маси тіла та паління ($p > 0,05$).

Висновки. Уперше виконаний аналіз зв'язку генетичного поліморфізму *ANRIL* із розвитком злоякісних пухлин сечостатевої системи в українській популяції. Отримані результати показали, що поліморфний локус rs4977574 не пов'язаний із ризиком виникненням раку передміхурової залози.

Ключові слова: довга некодуєча РНК, *ANRIL*, поліморфізм генів, рак простати.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є частиною НДР «Роль алельного поліморфізму генів у розвитку патологічних процесів і хвороб», № державної реєстрації 0110U005038.

Вступ. Результати світових епідеміологічних досліджень показують, що рак передміхурової залози (РПЗ) є другою за частотою причиною злоякісних новоутворень серед осіб чоловічої статі, викликаючи щорічно понад 1 200 000 нових випадків та спричиняючи близько 360 000 смертей [1]. Також повідомляється, що за прогнозами експертів до 2040 року кількість нових випадків РПЗ може зрости до 2 300 000 [2]. Саме тому зусилля багатьох дослідних центрів на сьогодні направлені на пошук та розкриття молекулярно-генетичних маркерів та детальних механізмів розвитку цієї патології.

За останні 15 років було виконано значну кількість експериментальних досліджень, результати яких показали міцний зв'язок геномного регіону Chr9p21 із виникненням раку передміхурової залози [3, 4, 5]. Сьогодні вже встановлено, що як на смислового, так і на антисмислового ланцюгу локуса Chr9p21 локалізується три гени супресорів пухлинного росту *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *CDKN2A/p14^{ARF}*, *CDKN2B/p15^{INK4B}*, ген метиладенозин фосфорилази (*MTAP*) та ген довгої некодуєчої РНК (днРНК) *ANRIL* (Antisense Noncoding RNA in the INK4 Locus, також відомої як *CDKN2B-AS1*) [6]. Вважається, що саме ген *ANRIL* є ключовим серед генів цього локусу у контексті виникнення та прогресії раку простати.

Результати досліджень *in vitro*, проведені колективом Yip et al., показали високий рівень продукції днРНК *ANRIL* у клітинних лініях раку простати (PC3 та PCa), порівняно з нормальними епітеліальними клітинами передміхурової залози та іншими раковими тканинами [7]. Група Zhao et al. також продемонструвала надмірний рівень експресії днРНК *ANRIL* у тканинах РПЗ [8]. Крім цього авторами було з'ясовано, що генетичний нокадаун *ANRIL* призводить до пригнічення проліферації та міграції клітин різних ліній раку простати (LNCap, PC3 та DU145). Більш того, молекулярний аналіз показав, що інактивація гена *ANRIL* пов'язана із інгібуванням сигнального шляху TGF- β 1/Smad.

Питання конкретних молекулярних механізмів роботи днРНК *ANRIL* на сьогодні остаточно ще не розкриті. Проте, вважається, що свій основний вплив транскрипти *ANRIL* реалізують через взаємодію із білками інгібitorних комплексів PRC1 та PRC2 (Polycomb repressive complex 1, 2). У кінцевому рахунку це призводить до епігенетичної цис-інактивації вже згаданих генів супресорів пухлинного росту, розташованих у Chr9p21-регіоні: *p16^{INK4A}*, *p14^{ARF}* та *p15^{INK4B}* [9].

Ген днРНК *ANRIL* (офіційна назва – CDKN2B-AS1; Gene ID: 100048912) складається із 126307 пар нуклеотидів (NC_000009.12) та містить щонайменше 21 екзон, з яких може утворюватись більше 20 різних лінійних та кільцевих ізоформ [10]. Станом на грудень 2021 року, за даними NCBI у гені *ANRIL* локалізовано 50580 поліморфних локусів (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=CDKN2B-AS1>).

Кілька досліджень показали зв'язок генетичного поліморфізму *ANRIL* із виникненням злоякісних пухлин молочної залози [11], легень [12] та крові [13]. Найбільш дослідженим одноклеотидним поліморфізмом цього гена є локус rs4977574, мінорний G-алель якого значно поширений серед багатьох популяцій [11, 14, 15]. Здебільшого роботи щодо rs4977574-сайту направлені на пошук його асоціації із хворобами серцево-судинної системи [14, 16, 17]. Крім цього групою Taheri et al. встановлений зв'язок rs4977574-поліморфізму із ризиком як доброякісної так і злоякісної гіперплазії простати в іранській популяції [18]. Відомості щодо розподілу різних алельних варіантів за поліморфним локусом rs4977574 гена *ANRIL* серед населення України майже відсутні. Питання можливого зв'язку поліморфного сайту rs4977574 із ризиком виникнення РПЗ в українській популяції зовсім не розкриті. Саме тому ми і вирішили виконати дане дослідження.

Метою дослідження став аналіз можливого зв'язку rs4977574-локусу гена днРНК *ANRIL* із виникненням раку передміхурової залози серед чоловіків української популяції.

Матеріал та методи дослідження. Загалом у дослідження було включено 250 осіб чоловічої статі. Із них до складу дослідної групи увійшло 184 хворих із РПЗ, а до складу контролю – 66 чоловіків без злоякісних пухлин в анамнезі. Усі пацієнти знаходились на лікуванні у Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері з 2005 по 2016 рік. Морфологічний діагноз раку простати був встановлений відповідно до рекомендацій Європейської асоціації урологів (European Association of Urology Guidelines). Усі хворі мали II клінічну стадію раку згідно із класифікацією TNM злоякісних пухлин.

Робота виконана у відповідності до положень Гельсінської декларації (1964 р., з подальшими доповненнями, включаючи версію 2000 р.) та Наказу МОЗ України №690 від 23.09.2009 р. Протокол дослідження затверджений Комітетом з біоетики медичного інституту Сумського державного університету. Всі учасники були інформовані щодо цілей, організації, методів дослідження та підписали інформовану згоду щодо участі у ньому, і вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнтів.

Забір цільної венозної крові для генетичного аналізу проводили в стерильних умовах у пробірках із ЕДТА об'ємом 2,4 мл («Sarstedt», Німеччина). Екстрагування ДНК із лейкоцитів крові виконували за допомогою комерційних наборів GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit («Thermo Fisher Scientific», США). З метою генотипування осіб груп порівняння за rs4977574-сайтом гена *ANRIL* використовували полімеразну ланцюгову реакцію в режимі реального часу (Real-time PCR). Реакцію проводили на приладі Quant Studio 5 DX Real-Time («Applied Biosystems», США) у присутності TaqMan assays (TaqMan®SNP Assay C_31720978_30). Температурний та часовий режим ланцюгової реакції визначав початкову 10-хвилинну денатурацію (95 °C) із подальшими 45 циклами ампліфікації протягом 15 с (95 °C) і 30 с (60 °C).

Результати молекулярно-генетичного аналізу статистично опрацьовували користуючись пакетом програм SPSS (версія 17.0). У тексті статті номінальні змінні показані у вигляді абсолютних та відсоткових значень. Безперервні данні представлені у вигляді $M \pm SD$. Для аналізу на нормальність розподілу використано тест Шапіро-Уїлка. Середні значення віку між контрольною та дослідною групами порівняні за допомогою t-Ст'юдента для незалежних вибірок. Аналіз відповідності розподілу rs4977574-генотипів рівновазі Харді-Вайнберга в обох групах, а також аналіз частот генотипів за rs4977574-локусом між різними групами виконаний за допомогою χ^2 -критерію Пірсона. З метою оцінки ризику настання РПЗ залежно від різних генотипів за rs4977574-сайтом гена *ANRIL* застосовували логістичну регресію в рамках домінантної, рецесивної та супердомінантної моделей успадкування. Для оцінки генотипної асоціації в умовах поправки на негенетичні фактори ризику (індекс маси тіла (ІМТ), вік, звичку палити) застосовували мультиваріабельну логістичну регресію. Значення показника p менше 0,05 приймали за статистично значущі.

Результати дослідження. Загальна характеристика чоловіків дослідної та контрольної груп представлена у **таблиці 1**. Зазначено, що вказані групи не відрізнялись за частотою осіб з надмір-

ною ($IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$) та нормальною ($IMT < 25 \text{ кг/м}^2$) вагою ($p = 0,152$). Натомість, кількість курців у групі з РПЗ була більшою, ніж у контролі ($p = 0,009$). Щодо віку, то середнє значення цього показника в осіб контрольної групи було значуще вищим, ніж у пацієнтів із пухлиною передміхурової залози ($p = 0,001$). Така обставина підвищує надійність відібраного контролю, оскільки дозволяє зменшити вірогідність виникнення злоякісних пухлин у цих осіб в майбутньому.

Таблиця 1 – Загальна характеристика чоловіків дослідної та контрольної груп

Показник	Контроль (n = 66)	АПЗ (n = 184)	p
Вік, роки \pm SD	76,80 \pm 9,05	73,03 \pm 7,56	0,001
Палять, n (%)	41 (62,1)	80 (43,5)	0,009
Не палять, n (%)	25 (37,9)	104 (56,5)	
IMT < 25 кг/м ² , n (%)	21 (31,8)	77 (41,8)	0,152
IMT \geq 25 кг/м ² , n (%)	45 (68,2)	107 (58,2)	

Примітки: РПЗ – рак передміхурової залози; IMT – індекс маси тіла; n – кількість осіб; p – показник статистичної значущості. Категоріальні змінні порівнювались за допомогою χ^2 -тесту, кількісні змінні – за допомогою t-тесту

Генотипування за поліморфним сайтом rs4977574 гена *ANRIL* дозволило отримати частоту розподілу різних алелів та генотипів за вказаним сайтом у групах порівняння. Частота мінорного G-алеля в контрольній групі склала – 0,485, а в дослідній групі – 0,471. Також було розраховано, що розподіл генотипів в обох групах не відхилився від очікуваної частоти відповідно до рівноваги Харді-Вайнберга ($p > 0,05$).

Частота різних генотипів (AA, AG, GG) за поліморфним сайтом rs4977574 гена *ANRIL* у різних підгрупах, а також результати порівняння їх розподілу наведені у **таблиці 2**. Виявлено, що загалом чоловіки контролю та пацієнти із РПЗ достовірно не відрізнялись за частотою rs4977574-генотипів ($p = 0,886$). Відповідний порівняльний аналіз окремо серед підгруп із нормальною ($IMT < 25 \text{ кг/м}^2$) та надмірною ($IMT \geq 25 \text{ кг/м}^2$) вагою також не виявив достовірної різниці ($p = 0,393$ та $p = 0,912$). Нами також було проведено порівняння частот генотипів за rs4977574-локусом окремо серед курців та осіб без звички курити. Значуща різниця була відсутньою в обох випадках ($p = 0,279$ для підгрупи курців; $p = 0,425$ для підгрупи без звички палити).

У **таблиці 3** показані результати аналізу зв'язку різних генотипів за rs4977574-сайтом гена *ANRIL* із ризиком настання РПЗ за допомогою ло-

Таблиця 2 – Частота генотипів за локусом rs4977574 гена *ANRIL* у різних підгрупах

Група	n	Генотип			p
		AA (%)	AG (%)	GG (%)	
Загальна група					
Контроль	100	21 (31,8)	26 (39,4)	19 (28,8)	0,886
РПЗ	184	64 (34,8)	67 (36,4)	53 (28,8)	
Не курці					
Контроль	41	15 (36,6)	18 (43,9)	8 (19,5)	0,425
РПЗ	80	28 (35,0)	28 (35,0)	24 (30,0)	
Курці					
Контроль	25	6 (24,0)	8 (32,0)	11 (44,0)	0,279
РПЗ	104	7 (34,6)	8 (37,5)	12 (27,9)	
IMT < 25 кг/м ²					
Контроль	21	5 (23,8)	10 (47,6)	6 (28,6)	0,393
РПЗ	77	28 (36,4)	25 (32,5)	24 (31,2)	
IMT \geq 25 кг/м ²					
Контроль	45	16 (35,6)	16 (35,6)	13 (28,9)	0,912
РПЗ	107	36 (33,6)	42 (39,3)	29 (27,1)	

Примітки: РПЗ – рак передміхурової залози; IMT – індекс маси тіла; n – кількість осіб; p – показник вірогідності, розрахований за χ^2 -критерієм

гістичної регресії. У загальній групі асоціація досліджуваного поліморфного локусу із виникнення злоякісної пухлини передміхурової залози була відсутньою в рамках усіх трьох застосованих моделей успадкування як до, так і після поправки на вік, IMT та звичку палити ($p > 0,05$). Відповідний регресійний аналіз зв'язку rs4977574-генотипів із ризиком розвитку РПЗ без урахування та із урахуванням негенетичних факторів ризику був виконаний нами також окремо у підгрупах, утворених на основі показника IMT та звички палити. Результати в рамках усіх моделей успадкування не виявили достовірного зв'язку ($p > 0,05$).

Обговорення результатів дослідження. Таким чином, у нашій роботі була перевірена асоціація одного із основних поліморфних варіантів rs4977574 гена днРНК *ANRIL* із розвитком раку передміхурової залози в українській популяції. Аналіз у загальній групі показав, що локус rs4977574 не пов'язаний із ризиком виникнення раку простати. Дослідження окремо в підгрупах, утвореними на основі показників IMT та звички курити, також не виявили причетності вказаного генетичного сайту до ризику настання РПЗ.

Деякі поліморфізми в гені *ANRIL* виявляють значну кореляцію із розвитком пухлин. Так, було показано, що TCGA-гаплотип гена *ANRIL* (rs1333045, rs1333048 rs4977574 і rs10757278) підвищує ризик розвитку раку молочної залози в іранських жінок [11]; поліморфізм rs2151280 сильно асоційований із виникненням оптичної гліоми у пацієнтів із нейрофіброматозом 1 типу [19] та пов'язаний із

Таблиця 3 – Результати регресійного аналізу зв'язку rs4977574-локусу гена *ANRIL* із ризиком виникнення раку передміхурової залози

Модель	P_c	ВШ _c (95% ДІ)	P_n	ВШ _n (95% ДІ)
Загальна група				
Домінантна	0,663	0,875 (0,480 -1,595)	0,512	0,812 (0,435-1,514)
Рецесивна	0,998	1,001 (0,538-1,862)	0,723	0,890 (0,466-1,697)
Наддомінантна	0,667	0,881 (0,494-1,570)	0,752	0,908 (0,498-1,653)
Не курці				
Домінантна	0,863	1,071 (0,489 -2,347)	0,969	0,984 (0,436-2,218)
Рецесивна	0,219	1,768 (0,713-4,385)	0,338	1,587 (0,617-4,816)
Наддомінантна	0,341	0,688 (0,319-1,485)	0,375	0,698 (0,315-1,546)
Курці				
Домінантна	0,313	0,596 (0,219-1,626)	0,354	0,615 (0,220-1,720)
Рецесивна	0,122	0,492 (0,200-1,209)	0,199	0,545 (0,216-1,376)
Наддомінантна	0,608	1,275 (0,503-3,229)	0,716	1,195 (0,458-3,121)
ІМТ <25 кг/м ²				
Домінантна	0,285	0,547 (0,181-1,653)	0,257	0,520 (0,168-1,611)
Рецесивна	0,819	1,132 (0,391-3,276)	0,556	1,309 (0,465-4,159)
Наддомінантна	0,203	0,529 (0,198-1,409)	0,083	0,399 (0,141-1,129)
ІМТ ≥ 25 кг/м ²				
Домінантна	0,821	1,088 (0,524-2,259)	0,976	0,988 (0,458-2,132)
Рецесивна	0,822	0,915 (0,423-1,982)	0,465	0,735 (0,321-1,680)
Наддомінантна	0,669	1,171 (0,568-2,414)	0,531	1,276 (0,595-2,734)

Примітки: ІМТ – індекс маси тіла; 95% ДІ – довірчий інтервал; P_c – спостережене значення P (без поправки на коваріати); ВШ_c – спостережене відношення шансів; P_n – значення P після поправки на вік, індекс маси тіла та куріння; ВШ_n – відношення шансів після поправки на коваріати.

рецидивом у пацієнтів із множинною мієломою [13]; при цьому локус rs1011970 впливає на схильність та лікування раку легень [12]. Крім цього, колектив Taheri M. et al. виконав аналіз зв'язку між раком простати, доброякісною гіперплазією простати та чотирма поліморфними локусами гена *ANRIL* (rs1333045, rs4977574, rs1333048 та rs10757278) в іранських пацієнтів [18]. Було показано, що локуси rs4977574, rs1333048, та rs10757278 асоційовані із виникненням пухлин передміхурової залози.

У нашій роботі було показано, що частота G-алелю серед контрольної групи становила 0,485, тоді як у загальній дослідній групі частота G-алеля склала 0,471. За даними проекту 1000 Genomes у загальній світовій популяції G-алель має середню частоту 0,395, серед Європейців – 0,492, серед населення обох Америк – 0,416, у Східній Азії – 0,531, у південній Азії – 0,484, серед популяцій Африки – 0,141 [20]. Більш детальні дані щодо країн Європи показують, що у відносно здорових представників Швеції алель G має частоту 0,448 [15], а серед фінського населення – 0,355 [21]. Отже, частота G-алеля за локусом rs4977574 гена *ANRIL* в українській популяції здебільшого відповідає цьому показнику в Європі та Південній Азії.

Відомо, що поліморфний локус rs4977574 розташований в 16-му інтроні гена *ANRIL* (103785-ме-

положення). На сьогодні дискутабельним лишається питання ефекту цього сайту на транскрипцію, функціонування днРНК *ANRIL* та розвиток пухлинного фенотипу. Згідно з основною гіпотезою, вважається, що генотип за інтронним локусом rs4977574 може впливати на баланс між утворенням лінійних та кільцевих ізоформ молекули *ANRIL* [22]. Пропонується, що наявність G-алеля призводить до посиленого утворення лінійних ізоформ *ANRIL* на фоні зменшення експресії кільцевої *ANRIL*. Саме лінійні ізоформи молекули цієї днРНК здатні активувати роботу PRC1, призводячи таким чином до репресії пухлинних супресорів (*CDKN2A* та *CDKN2B*) і в решті-решт до надмірної проліферації клітин разом із пригніченням в них апоптозу. Натомість, A-алель може сприяти посиленому утворенню кільцевих ізоформ *ANRIL*. Останні здатні пригні-

чувати активність комплексу ReBoW, необхідного для дозрівання рРНК. Це у свою чергу призводить до дефіциту рРНК, нуклеолярного стресу та активації білку p53, що завершується пригнічення клітинного поділу та запуску апоптозу.

Слід зазначити, що у нашому дослідженні типу випадок-контроль є декілька обмежень, що мають бути враховані. Кількість осіб, залучених до нашого дослідження була відносно невеликою. Крім цього, нами не було проведено вивчення зв'язку різних генотипів за поліморфним сайтом rs4977574 із експресією *ANRIL*. Однак, ми сподіваємось, що такі експерименти будуть виконані нами в подальшому, а результати цієї роботи стануть важливою частиною для майбутнього мета-аналізу зв'язку rs4977574-локусу із розвитком злоякісних пухлин в європейських популяціях.

Висновки

1. Уперше виконаний аналіз зв'язку генетичного поліморфізму *ANRIL* із розвитком злоякісних пухлин уrogenітального тракту в українській популяції.
2. Отримані результати показали, що поліморфний локус rs4977574 не пов'язаний із ризиком виникнення раку передміхурової залози.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні зв'язку між поліморфним локусом rs4977574 гена днкРНК *ANRIL* із клінічними, лабораторними та морфологічними характеристиками злоякісних пухлин сечостатевої системи, а також у вивченні впливу різних варіантів за rs4977574-локусом на рівень експресії гена *ANRIL*.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. PMID: 30207593. doi: 10.3322/caac.21492
2. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63-89. PMID: 31068988. PMCID: PMC6497009. doi:10.14740/wjon1191
3. Gu F, Pfeiffer RM, Bhattacharjee S, et al. Common genetic variants in the 9p21 region and their associations with multiple tumours. *Br J Cancer*. 2013;108(6):1378-1386. PMID: 23361049. PMCID: PMC3619272. doi: 10.1038/bjc.2013.7
4. Barros ÉAF, Pontes-Junior J, Reis ST, Lima AER, Souza IC, Siqueira JL, et al. Correlation between chromosome 9p21 locus deletion and prognosis in clinically localized prostate cancer. *Int J Biol Markers*. 2017;32(2):e248-e254. PMID: 28058701. doi: 10.5301/ijbm.5000242
5. Li WQ, Pfeiffer RM, Hyland PL, Shi J, Gu F, Wang Z, et al. Genetic polymorphisms in the 9p21 region associated with risk of multiple cancers. *Carcinogenesis*. 2014;35(12):2698-2705. PMID: 25239644. PMCID: PMC4247519. doi: 10.1093/carcin/bgu203
6. Holdt LM, Teupser D. Long Noncoding RNA ANRIL: Lnc-ing Genetic Variation at the Chromosome 9p21 Locus to Molecular Mechanisms of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:145. PMID: 30460243. PMCID: PMC6232298. doi: 10.3389/fcvm.2018.00145
7. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. 2010;38(5):662-674. PMID: 20541999. PMCID: PMC2886305. doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.021
8. Zhao B, Lu YL, Yang Y, Hu LB, Bai Y, Li RQ, et al. Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF-β1/Smad signaling pathway. *Cancer Biomark*. 2018;21(3):613-620. PMID: 29278879. PMCID: PMC5859458. doi: 10.3233/CBM-170683
9. Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health. *Int J Mol Sci*. 2013;14(1):1278-1292. PMID: 23306151. PMCID: PMC3565320. doi: 10.3390/ijms14011278
10. Kong Y, Hsieh CH, Alonso LC. ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:405. PMID: 30087655. PMCID: PMC6066557. doi: 10.3389/fendo.2018.00405
11. Khorshidi H, Taheri M, Noroozi R, Sarrafzadeh S, Sayad A, Ghafouri-Fard S. ANRIL Genetic Variants in Iranian Breast Cancer Patients. *Cell J*. 2017;19(Suppl 1):72-78. doi: 10.22074/cellj.2017.4496
12. Gong WJ, Yin J, Li XP, Fang C, Xiao D, Zhang W, et al. Association of well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms with lung cancer susceptibility and platinum-based chemotherapy response. *Tumour Biol*. 2016;37(6):8349-8358. PMID: 26729200. doi: 10.1007/s13277-015-4497-5
13. Poi M, Li J, Sborov D, VanGundy Z, Cho Y, Lamprecht M, et al. Polymorphism in ANRIL is associated with relapse in patients with multiple myeloma after autologous stem cell transplant. *Mol Carcinog*. 2017;56(7):1722-1732. PMID: 28150872. doi: 10.1002/mc.22626
14. Xu B, Fang Z, He S, Wang J, Yang X. ANRIL polymorphism rs4977574 is associated with increased risk of coronary artery disease in Asian populations: A meta-analysis of 12,005 subjects. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(39):e12641. PMID: 30278588. PMCID: PMC6181537. doi: 10.1097/MD.0000000000001264
15. Hindy G, Ericson U, Hamrefors V, Drake I, Wirfält E, Melander O, et al. The chromosome 9p21 variant interacts with vegetable and wine intake to influence the risk of cardiovascular disease: a population based cohort study. *BMC Med Genet*. 2014;15:1220. PMID: 25551366. PMCID: PMC4331503. doi: 10.1186/s12881-014-0138-x
16. Nelson CP, Goel A, Butterworth AS, Kanoni S, Webb TR, Marouli E, et al. Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nat Genet*. 2017;49(9):1385-1391. PMID: 28714975. doi: 10.1038/ng.3913
17. Wang Q, Zhao J, Chang H, Liu X, Zhu R. Association between lncRNA ANRIL genetic variants with the susceptibility to ischemic stroke: From a case-control study to meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(11):e25113. PMID: 33725991. PMCID: PMC7982178. doi: 10.1097/MD.00000000000025113
18. Taheri M, Poursmaeili F, Omrani MD, Habibi M, Sarrafzadeh S, Noroozi R et al. Association of ANRIL gene polymorphisms with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in an Iranian population. *Biomark Med*. 2017;11(5):413-422. PMID: 28621612. doi: 10.2217/bmm-2016-0378

19. Tritto V, Ferrari L, Esposito S, Zuccotti P, Bianchessi D, Natacci F. Non-Coding RNA and Tumor Development in Neurofibromatosis Type 1: ANRIL Rs2151280 Is Associated with Optic Glioma Development and a Mild Phenotype in Neurofibromatosis Type 1 Patients. *Genes (Basel)*. 2019;10(11): E892. PMID: 31694342. PMCID: PMC6895873. doi: 10.3390/genes10110892
20. Yuan W, Zhang W, Zhang W, Ruan ZB, Zhu L, Liu Y, et al. New findings in the roles of Cyclin-dependent Kinase inhibitors 2B Antisense RNA 1 (CDKN2B-AS1) rs1333049 G/C and rs4977574 A/G variants on the risk to coronary heart disease. *Bioengineered*. 2020;11(1):1084-1098. PMID: 33054494. PMCID: PMC8291866. doi: 10.1080/2020.1827892
21. Kunnas T, Piesanen J, Nikkari ST. Association of a Chromosome Locus 9p21.3 CDKN2B-AS1 Variant rs4977574 with Hypertension: The TAMRISK Study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018;22(5):327-330. PMID: 29791233. doi: 10.1089/gtmb.2017.0249
22. Sarkar D, Oghabian A, Bodiabadu PK, Joseph WR, Leung EY, Finlay GJ, et al. Multiple Isoforms of ANRIL in Melanoma Cells: Structural Complexity Suggests Variations in Processing *Int J Mol Sci*. 2017;18(7):1378. PMID: 28653984. PMCID: PMC5535871. doi: 10.3390/ijms18071378

УДК 616.6-006: 577.213 / .216

АНАЛИЗ СВЯЗИ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА rs4977574 ГЕНА ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК ANRIL С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Волкогон А. Д., Гарбузова В. Ю., Атаман А. В.

Резюме. Целью данной работы стало исследование возможной связи rs4977574-полиморфизма гена днкРНК ANRIL с возникновением рака предстательной железы среди мужчин украинской популяции.

Материал и методы. В исследование было вовлечено 250 человек мужского пола. Из них в состав опытной группы вошли 184 больных с раком предстательной железы, а в состав контроля – 66 мужчин без злокачественных образований в анамнезе. Генотипирование по rs4977574-локусу гена ANRIL реализовано с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-time PCR). Реакция проводилась на приборе Quant Studio 5 DX Real-Time (Applied Biosystems, США) в присутствии TaqMan assays (TaqMan@SNP Assay C_31720978_30).

Результаты. Последние экспериментальные исследования показали причастность длинной некодирующей РНК ANRIL к развитию злокачественных опухолей разной локализации. При этом практически отсутствует информация о роли полиморфизма гена этой РНК в возникновении рака предстательной железы. Вопрос возможной связи генетического полиморфизма ANRIL с риском наступления рака предстательной железы в украинской популяции совсем не раскрыт.

В результате выполненного генотипирования было установлено, что мужчины контроля и пациенты с раком предстательной железы достоверно не отличались по частоте rs4977574-генотипов ($p = 0,886$). Не было выявлено достоверной разницы при соответствующем сравнении и отдельно среди лиц с нормальным весом, избыточным весом, без и с привычкой курить ($p > 0,05$). Анализ связи разных генотипов по rs4977574-сайту гена ANRIL с риском наступления рака предстательной железы с помощью логистической регрессии также не показал достоверной связи в рамках разных моделей наследования как до, так и после поправки на возраст, индекс массы тела и курение ($p > 0,05$).

Выводы. В исследовании впервые выполнен анализ связи генетического полиморфизма ANRIL с развитием злокачественных опухолей мочеполовой системы в украинской популяции. Полученные результаты показали, что полиморфный локус rs4977574 не связан с риском возникновения рака предстательной железы.

Ключевые слова: длинная некодирующая РНК, ANRIL, полиморфизм генов, рак простаты.

UDC 616.6-006: 577.213 / .216

Analysis of the Link between rs4977574 Single Nucleotide Polymorphism of the Long Non-Coding RNA ANRIL Gene and Prostate Cancer Development

Volkogon A. D., Harbuzova V. Yu., Ataman O. V.

Abstract. The purpose of the study was to investigate the possible association between ANRIL gene rs4977574-polymorphism and prostate cancer occurrence among men of the Ukrainian population.

Materials and methods. A total of 250 males were enrolled in the study. Of these, the experimental group included 184 prostate cancer patients, and the control group included 66 men without a history of malignant tumors. Genotyping of the ANRIL rs4977574 locus was performed by real-time polymerase chain reaction. The reaction was performed on a Quant Studio 5 DX Real-Time instrument (Applied Biosystems, USA) in the

presence of TaqMan assays (TaqMan®SNP Assay C_31720978_30). The genotyping results were statistically processed using the SPSS software package (version 17.0). Values of p less than 0.05 were considered as statistically significant.

Results and discussion. ANRIL (Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus), also known as CDKN2B-AS1, is a long non-coding RNA (3.8-kb) transcribed from the short arm of the human chromosome 9 (p21.3). ANRIL transcripts promote their main molecular effects through interaction with proteins of Polycomb repressive complex 1 and Polycomb repressive complex 2. Ultimately, this leads to epigenetic cis-inactivation of the tumor growth suppressor genes located in the Chr9p21 region: *CDKN2A/p16^{INK4A}*, *CDKN2A/p14^{ARF}*, *CDKN2B/p15^{INK4B}*. Recent experimental studies have demonstrated the involvement of ANRIL in the development of malignant tumors of different localization. At the same time, there is almost no information about the role of the gene polymorphisms of this RNA in the occurrence of prostate cancer. The possible link between ANRIL gene polymorphism and prostate cancer risk in the Ukrainian population is not fully understood.

It was found that the control men and prostate cancer patients did not differ significantly in the frequency of rs4977574-genotypes ($p = 0.886$). No significant difference was found during the corresponding comparison separately among persons with normal weight, overweight, without, and with the habit of smoking ($p > 0.05$). Analysis of the association of different rs4977574 genotypes of the ANRIL gene with the risk of prostate cancer using logistic regression also did not show a reliable relationship under different models of inheritance, both before and after adjustment for age, body mass index and smoking ($p > 0.05$).

Conclusion. Thus, for the first time, we performed an analysis of the relation between ANRIL gene polymorphism and the development of malignant tumors of the genitourinary system in the Ukrainian population. The results showed that the polymorphic locus rs4977574 is not associated with the risk of prostate cancer.

Keywords: long non-coding RNA, ANRIL, gene polymorphism, prostate cancer.

ORCID and contributionship:

Andriy V. Volkogon : 0000-0003-0835-0657 ^{B,D}

Viktoriiia Yu. Harbuzova : 0000-0001-7183-6997 ^{A,C}

Alexander V. Ataman : 0000-0002-1941-740X ^{E,F}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Andriy V. Volkogon

Sumy, Sumy State University,
Department of Surgery and Oncology
25, Myra St., apt. 224, Sumy 40007, Ukraine
tel: + 380955008623, e-mail: volkogon_andrei@ukr.net

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 12.11.2021 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування