

Аналіз зв'язку rs1899663-поліморфізму гена *HOTAIR* із розвитком раку сечового міхура в українській популяції

А. Д. Волкогон*^В, Я. Д. Чумаченко^Д, В. Ю. Гарбузова^{С,Е}, О. В. Атаман^{А,Ф}

Сумський державний університет, Україна

А – концепція та дизайн дослідження; В – збір даних; С – аналіз та інтерпретація даних; Д – написання статті; Е – редагування статті; Ф – остаточне затвердження статті

HOX antisense intergenic RNA (*HOTAIR*), що належить до класу довгих некодувальних РНК (днРНК), здійснює епігенетичну регуляцію експресії генів, причетних до клітинного поділу. Це дає підстави припустити: однонуклеотидні поліморфізми гена *HOTAIR* можуть впливати на розвиток пухлинних процесів, зокрема раку сечового міхура.

Мета роботи – проаналізувати зв'язок rs1899663-поліморфізму гена *HOTAIR* із виникненням раку сечового міхура та його здатністю до метастазування у представників української популяції.

Матеріали та методи. Для дослідження використали цільну венозну кров 241 особи (141 хворий на рак сечового міхура та 100 осіб групи контролю). Для генотипування застосована полімеразна ланцюгова реакція з аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). Статистичне опрацювання результатів виконали за допомогою програмного забезпечення SPSS 17.0.

Результати. Встановлена відсутність зв'язку між rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* і виникненням раку сечового міхура як за даними бінарної логістичної регресії, так і після врахування поправок на вік, стать і звичку курити ($P_{\text{спост}} > 0,05$ та $P_{\text{попр}} > 0,05$ в усіх моделях спадкування).

Натомість показано, що ризик розвитку метастазування раку сечового міхура в носіїв ТТ-генотипу менший, ніж у носіїв G-алеля відповідно до рецесивної ($P_{\text{спост}} = 0,047$; $OR_{\text{спост}} = 0,334$, 95 % CI = 0,113–0,986) моделі спадкування. До того ж, за даними адитивної моделі спадкування, ризик розвитку метастазування в осіб із ТТ-генотипом менший, ніж у гомозигот за основним алелем ($P_{\text{спост}} = 0,04$; $OR_{\text{спост}} = 0,301$, CI = 0,096–0,944).

Але після застосування поправок на вік, стать, куріння та зловживання алкоголем статистично значущий зв'язок зник і в рецесивній ($P_{\text{попр}} = 0,09$; $OR_{\text{попр}} = 0,386$, 95 % CI = 0,129–1,159), і в адитивній ($P_{\text{попр}} = 0,076$; $OR_{\text{попр}} = 0,348$, CI = 0,108–1,118) моделі спадкування.

Висновки. Зв'язок між rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* і виникненням і метастазуванням раку сечового міхура в українській популяції відсутній.

Ключові слова:

довгі некодувальні РНК, однонуклеотидний поліморфізм, HOX antisense intergenic RNA (*HOTAIR*), рак сечового міхура.

Запорізький

медичний журнал. – 2019. – Т. 21, № 6(117). – С. 751–758

DOI:

10.14739/2310-1210.2019.6.186498

*E-mail:

volkogon_andrei@ukr.net

Анализ связи rs1899663-полиморфизма гена *HOTAIR* с развитием рака мочевого пузыря в украинской популяции

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

HOX antisense intergenic RNA (*HOTAIR*), относящаяся к классу длинных некодирующих РНК (днРНК), осуществляет эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, причастных к клеточному делению. Это позволяет предположить, что однонуклеотидные полиморфизмы гена *HOTAIR* могут оказывать влияние на развитие опухолевых процессов, в частности рака мочевого пузыря.

Цель работы – проанализировать связь rs1899663-полиморфизма гена *HOTAIR* с возникновением рака мочевого пузыря и его способностью к метастазированию у представителей украинской популяции.

Материалы и методы. Для исследования использована цельная венозная кровь 241 пациента (141 больной раком мочевого пузыря и 100 лиц группы контроля). Для генотипирования использовали полимеразную цепную реакцию с анализом длины рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP). Статистическая обработка результатов проведена при помощи программного обеспечения SPSS 17.0.

Результаты. Установлено отсутствие связи между rs1899663-полиморфизмом гена *HOTAIR* и возникновением рака мочевого пузыря как по данным бинарной логистической регрессии, так и после применения поправок на возраст, пол и курение ($P_{\text{набл}} > 0,05$ и $P_{\text{набл}} > 0,05$ во всех моделях наследования).

Также показано, что риск развития метастазирования рака мочевого пузыря у носителей ТТ-генотипа меньше, чем у носителей G-аллеля в соответствии с рецессивной ($P_{\text{набл}} = 0,047$; $OR_{\text{набл}} = 0,334$, 95 % CI = 0,113–0,986) моделью наследования. Более того, по данным аддитивной модели наследования, риск развития метастазирования у лиц с ТТ-генотипом меньше по сравнению с обладателями GG-генотипа ($P_{\text{набл}} = 0,04$; $OR_{\text{набл}} = 0,301$, CI = 0,096–0,944).

Однако после применения поправок на возраст, пол, курение и злоупотребление алкоголем статистически значимая связь исчезла как в рецессивной ($P_{\text{попр}} = 0,09$; $OR_{\text{попр}} = 0,386$, 95 % CI = 0,129–1,159), так и в аддитивной ($P_{\text{попр}} = 0,076$; $OR_{\text{попр}} = 0,348$, CI = 0,108–1,118) моделях наследования.

Выводы. Связь между rs1899663-полиморфизмом гена *HOTAIR* и возникновением, а также метастазированием рака мочевого пузыря среди представителей украинской популяции отсутствует.

Ключевые слова:

длинные некодирующие РНК, однонуклеотидный полиморфизм гена, HOX antisense intergenic RNA (*HOTAIR*), рак мочевого пузыря.

Запорожский медицинский журнал. – 2019. – Т. 21, № 6(117). – С. 751–758

Key words:

long noncoding RNAs, single nucleotide polymorphism, HOX antisense intergenic RNA (HOTAIR), cell bladder cancer.

Zaporozhye medical journal 2019; 21 (6), 751–758

Association analysis between rs1899663 HOTAIR gene polymorphism and bladder cancer development in Ukrainian population

A. D. Volkohon, Ya. D. Chumachenko, V. Yu. Harbuzova, O. V. Ataman

HOX antisense intergenic RNA (HOTAIR), the well-known long noncoding RNA (lncRNA), performs epigenetic regulation of cell cycle genes expression. Based on this fact it can be assumed that HOTAIR single nucleotide polymorphisms (SNPs) affect the development of different oncological processes, in particular, bladder cancer.

The aim of the study: to analyze the association between HOTAIR rs1899663 single nucleotide polymorphism and bladder cancer emergence as well as metastasis potential in Ukrainian population.

Materials and methods. Venous whole blood from 241 patients was used for genotyping. The studied group was formed from 141 patients with diagnosed bladder cancer and the control group was consisted of 100 healthy subjects. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) was used for genotyping. The statistical processing of obtained results was done by SPSS 17.0 software.

Results. There was no association between HOTAIR rs1899663 SNP and bladder cancer emergence according to the binary logistic regression analysis as well as after adjustment for age, sex and smoking ($P_c > 0.05$ and $P_a > 0.05$ for all hereditary models). In contrast, it was shown that the TT-genotype carriers have decreased risk of bladder cancer metastasis compared to G-allele carriers in the recessive ($P_c = 0.047$; $OR_c = 0.334$, 95 % CI = 0.113–0.986) model. Moreover, TT-genotype carriers have decreased risk of bladder cancer metastasis in comparison with GG-genotype carriers according to the additive ($P_c = 0.04$; $OR_c = 0.301$, CI = 0.096–0.944) model. But after the adjustment for age, sex, smoking and alcohol consumption, the statistically significant association was lost both in recessive ($P_a = 0.09$; $OR_a = 0.386$; 95 % CI = 0.129–1.159) and additive ($P_a = 0.076$; $OR_a = 0.348$; CI = 0.108–1.118) models.

Conclusions. There is no association between HOTAIR rs1899663 SNP and bladder cancer emergence as well as metastasis potential in Ukrainian population.

За даними Global Burden of Disease (GBD), злоякісні пухлини посідають друге місце серед причин смертності, поступаючи тільки захворюванням серцево-судинної системи. Загальна кількість зареєстрованих випадків раку у світі станом на 2015 рік становила 17,5 млн, а кількість померлих у результаті розвитку пухлинних процесів сягнула 8,7 млн осіб [1,2]. У структурі смертності серед онкологічних патологій рак сечового міхура посів 13 місце, а рівень захворюваності підвищився на 31 % за період 2005–2015 рр. [2]. Результати епідеміологічних досліджень вказують на необхідність розроблення методів своєчасної профілактики та ефективного лікування онкологічних хвороб, зокрема раку сечового міхура, що не можливо без детального вивчення причин і закономірностей розвитку пухлинних процесів.

Відомо, що сутністю канцерогенезу є безмежний і неконтрольований поділ клітини, яка зазнала пухлинної трансформації. Безпосередніми причинами перетворення нормальної клітини на ракову вважають мутації генів, що пов'язані з проходженням клітинного поділу, або порушення регуляції їхньої експресії [3]. Активність генів залежить від стану їхніх регуляторних ділянок і ступеня конденсації хроматину, тобто контролюється за допомогою епігенетичних механізмів (наприклад, ацетилювання чи деацетилювання гістонових білків, метилювання та деметилювання CpG-острівців промоторних ділянок генів) [4,5]. Важлива роль у здійсненні таких хімічних модифікацій належить довгим некодувальним РНК (днРНК). Цей клас РНК об'єднує транскрипти з довжиною, понад 200 нуклеотидів, що не мають відкритої рамки читування суттєвого розміру [6,7]. Нині однією з найбільш досліджуваних є HOX antisense intergenic RNA (HOTAIR) – міжгенна антизмістовна днРНК, що бере участь у регуляції експресії багатьох генів на епігенетичному та транскрипційному рівнях. Ген HOTAIR входить до складу генного кластера Homeobox C (HOXC), а його кодувальний ланцюг є частиною мінус-ланцюга довгого

плеча хромосоми 12q13.13 [8]. Відомо, що HOTAIR зв'язується із PRC2 та LSD1 і транспортує ці білкові комплекси до певних генетичних локусів (наприклад, HOXD10, PTEN, RBM38, MMPs) [9]. У результаті HOTAIR-опосередкованого метилювання лізинових залишків Lys-27 (H3K27) і деметилювання Lys-4 (H3K4) у складі гістонів H3 відбувається зниження експресії генів, що причетні до здійснення клітинного поділу [10]. Саме тому зусилля багатьох вчених сьогодні спрямовані на дослідження ролі HOTAIR у розвитку пухлинної трансформації клітин.

Є чимало праць, що присвячені визначенню активності гена HOTAIR у пухлинних зразках. Зокрема, Yu et al. [11] узагальнили результати, що свідчать про підвищення експресії цього гена при різних типах пухлин, серед них рак молочної залози, стравоходу, легень, шлунка, печінки, гортані, підшлункової залози, гліоми та саркоми. HOTAIR унаслідок активації генетичних механізмів епітеліально-мезенхімального переходу збільшує інвазивність і рухливість пухлинних клітин, що призводить до утворення віддалених метастатичних вогнищ. Martínez-Fernández et al [12] з'ясували, що підвищення рівня експресії HOTAIR у тканинах пухлин сечового міхура, що рецидивують, пов'язане з гіршим прогнозом щодо виживання. Yu et al. [13] довели HOTAIR-залежний онкогенний ефект білка HuR, який здатен зв'язуватися з AU-повторами молекул РНК. Пригнічення експресії HuR/HOTAIR у ракових клітинах сечового міхура призводило до зниження їхньої інвазивності, проліфераційної та міграційної активності з одночасною стимуляцією апоптозу. Sun et al. [14] встановили HOTAIR-опосередковане зниження експресії miR-205 у пухлинних тканинах сечового міхура внаслідок метилювання H3K27 і деметилювання H3K4 промоторної ділянки гена цієї мікроРНК. Виявилось, що miR-205 пригнічує активність CCNJ, який кодує циклін J – важливий регулятор клітинного циклу, необхідний для G2/M-переходу. Відповідно, надлишкова експресія HOTAIR у ракових клітинах сечового міхура

призводить до підвищення активності *CCNJ* і, як наслідок, посиленої проліферації пухлини.

Отже, встановлення молекулярних механізмів *HOTAIR*-опосередкованого канцерогенезу триває, хоча нині накопичено доволі багато інформації щодо порушеного питання. Однак варто відзначити, що причини підвищення експресії цієї днРНК у пухлинних клітинах є менш дослідженими. Тому один із найперспективніших сучасних напрямів молекулярної генетики стосується вивчення функціонального значення односторонніх поліморфізмів генів, а також їхнього зв'язку з розвитком, перебігом пухлинних процесів.

Мета роботи

Аналіз зв'язку rs1899663-поліморфних варіантів гена *HOTAIR* із виникненням раку сечового міхура та його здатності до метастазування у представників української популяції.

Матеріали і методи дослідження

Характеристика груп порівняння. У дослідження залучили 241 особу, котрих поділили на дослідну групу, представники якої мали рак сечового міхура (27 жінок і 114 чоловіків; середній вік [±SD] – 62,88 ± 12,91 року) та групу контролю (34 жінки і 66 чоловіків; середній вік – 77,38 ± 8,49 року). Діагностику онкологічної патології та ведення пацієнтів здійснили в Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері з 2005 до 2016 р. Остаточний морфологічний діагноз перехідно-клітинного раку сечового міхура (ПКРСМ) встановлений відповідно до міжнародних критеріїв European Association of Urology Guidelines. Усі пацієнти мали клінічну стадію II пухлинного процесу за TNM-класифікацією злоякісних пухлин. Загальні клінічні характеристики онкологічних хворих і представників контрольної групи наведені в таблиці 1. Середній вік контрольних осіб вірогідно вищий за такий для досліджуваної групи. Цей факт підвищує надійність контролю, адже ймовірність розвитку пухлинної патології на наступних етапах життя його представників зменшується. Основні клінічні характеристики груп порівняння, що були сформовані для вивчення метастатичного потенціалу пухлин, наведені в таблиці 2. Протокол дослідження затверджений Комітетом з етики Медичного інституту СумДУ (№3/05.12.11) та відповідає основним положенням Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації. Усі пацієнти надали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні.

Генотипування. Для дослідження використовували цільну венозну кров пацієнтів, взяту у стерильних умовах у моновети об'ємом 2,4 мл із калієвою сіллю етилендіамінтетраацетової кислоти («Sarstedt», ФРН) як антикоагулянт. Виділення ДНК виконали за стандартним протоколом, використовуючи GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Для генотипування пацієнтів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* застосована полімеразна ланцюгова реакція з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP). На етапі ампліфікації реакційна суміш складалася з 5 мМ DreamTaq™ Green Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific,

Таблиця 1. Клінічні характеристики хворих на ПКРСМ та осіб контрольної групи

Показник	ПКРСМ (n = 141)	Контроль (n = 100)	p
Вік, роки ± SD	62,88 ± 12,91	77,38 ± 8,49	< 0,001
Стать, ж/ч	27/114	34/66	0,009
Курці, n (%)	70 (49,6)	27 (27,0)	< 0,001

ПКРСМ: перехідноклітинний рак сечового міхура; **n:** кількість осіб; **ж:** жінки; **ч:** чоловіки; **p:** показник статистичної значущості; порівняння категоріальних змінних виконали за допомогою χ^2 -тесту, кількісних змінних – за допомогою t-тесту.

Таблиця 2. Клінічні характеристики хворих на ПКРСМ із метастазуванням пухлини та без нього

Показник	Метастази (n = 68)	Немає метастазів (n = 73)	p
Вік, роки ± SD	64,41 ± 13,06	61,45 ± 12,69	0,175
Стать, ж/ч	14/54	13/60	0,675
Курці, n (%)	34 (50,0)	36 (49,3)	0,935
Алкоголь	42 (61,8)	58 (79,5)	0,021

ПКРСМ: перехідноклітинний рак сечового міхура; **n:** кількість осіб; **ж:** жінки; **ч:** чоловіки; **p:** показник статистичної значущості; порівняння категоріальних змінних виконали за допомогою χ^2 -тесту, кількісних змінних – за допомогою t-тесту.

USA), 0,5 мМ dNTP (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,1 мМ кожного праймера, 1 U Taq-полімерази (Thermo Fisher Scientific, USA), 75–100 нг ДНК і деіонізованої води (загальний об'єм 25 мкл). Полімеразну ланцюгову реакцію здійснили за допомогою ампліфікатора Thermocycler GeneAmp PCR System 2700 (Thermo Fisher Scientific, USA), температурний режим наведений у таблиці 3. На етапі рестрикції до 6 мкл ампліфікату додавали 2 мкл ендонуклеази рестрикції *BseG1* у буферному розчині Buffer Tango (Thermo Fisher Scientific, USA). Зразки інкубували в термостаті за температури 37 °C протягом 20 год.

Праймери підібрані так, щоб обмежити послідовність ДНК завдовжки 401 пн, що містить rs1899663-поліморфний сайт. Однак ампліфікат унаслідок наявності конститутивного сайту рестрикції під дією ендонуклеази *BseG1* розрізався на 2 фрагменти – 76 пн і 325 пн. Унаслідок трансверсії G→T у положенні 4093 (rs1899663-поліморфізм) гена *HOTAIR* (NC_000012.12) утворюється додатковий сайт рестрикції *BseG1*. Поряд з утворенням фрагмента з 76 пн, фрагмент довжиною 325 пн розрізається на 2 додаткових – 63 пн і 262 пн. За наявності в ампліфікаті G-алеля утворюється тільки два фрагменти – 76 пн і 325 пн (рис. 1А). Для розділення продуктів рестрикції застосовували горизонтальний електрофорез (10 V/cm) у 2,5 % агарозному гелі з додаванням розчину бромистого етидію (10 мг/мл). Дискримінація генотипів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* виконана за допомогою транслюмінатора («Биоком», РФ). Результати рестрикційного аналізу наведені на рис. 1Б.

Статистичний аналіз. Більшість статистичних розрахунків здійснені за допомогою програмного забезпечення SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA). Категоріальні змінні наведені як абсолютні та відсоткові значення; безперервні дані наведені як середні значення ± SD (нормальність розподілу даних підтверджувалася за допомогою тесту Шапіро–Уїлка). Для порівняння середніх значень застосовували двосторонній t-тест Стьюдента. Відповідність розподілу частот алелів у контрольній групі перевіряли за допомогою програмного забезпечення Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology Studies (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>). Для порівняння частот алелів і генотипів, а також інших

Таблиця 3. Умови ампліфікації для rs1899663-поліморфізму гена *HOTAIR*

Праймери	Етапи ампліфікації			Довжина ампліфікату
Прямий: 5'TGAAAGCCAGGATCATTTAACA3'	Денатурація	Гібридація	Елонгація	401 пн
Зворотний: 5'GGGCTCATGGAGACATTTAAG3'	94 °C – 45 с	59 °C – 45 с	72 °C – 45 с	

пн: пари нуклеотидів.

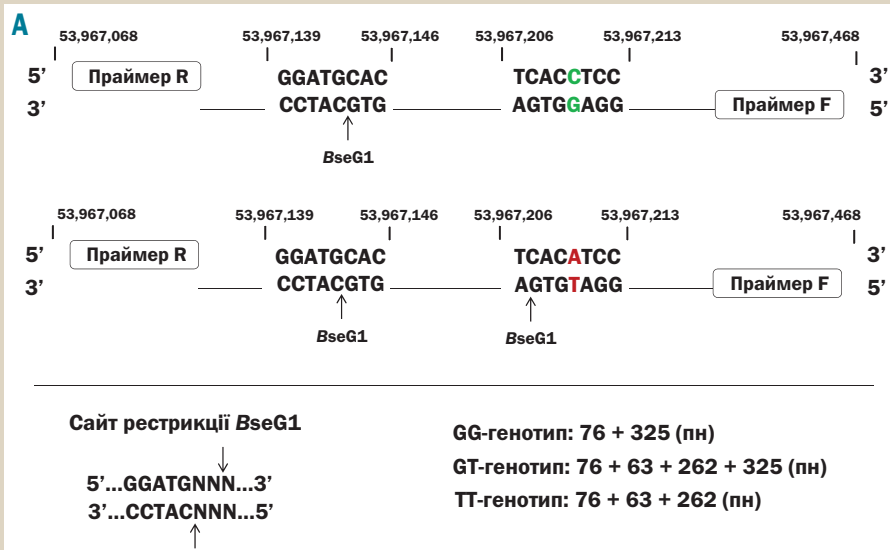
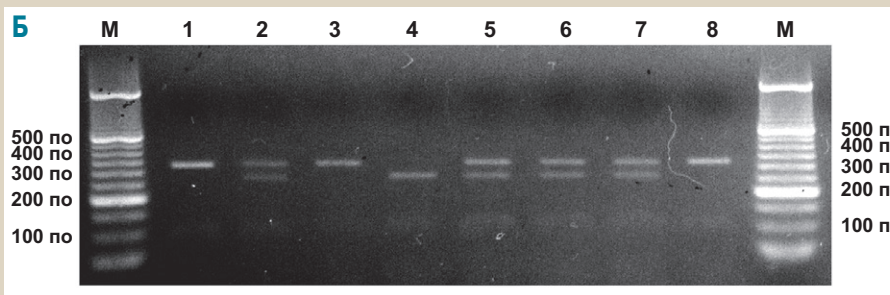


Рис. 1. Результати рестрикційного аналізу за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR*.

А: Зліва – сайт рестрикції *BseG1*; стрілками позначені місця нанесення рестриктазою одноланцюгових розрізів послідовності ДНК; **N** – будь-який нуклеотид. Посередині – послідовність нуклеотидів ампліфікату відповідно до NC_000012.12; **Праймер R** – зворотний праймер; **Праймер F** – прямий праймер; **послідовність 53,967,139 – 53,967,146** відповідає конститутивному сайту рестрикції *BseG1*; **послідовність 53,967,206 – 53,967,213** утворює додатковий сайт рестрикції *BseG1* унаслідок заміни G на T у положенні 53,967,210 (rs1899663); стрілками позначені місця нанесення одноланцюгового розрізу послідовності ДНК рестриктазою *BseG1*; **червоним кольором** позначений поліморфний сайт rs1899663. Справа вказана відповідність між генотипом і довжиною утворених фрагментів рестрикції; **пн** – пари нуклеотидів.



Б: **M** – молекулярний маркер; **по** – пари основ; **доріжки 1, 3, 8** – GG-генотип; **доріжки 2, 5, 6, 7** – GT-генотип; **доріжка 4** – TT-генотип.

категоріальних змінних застосовували χ^2 -тест. Зв'язок генотипів із розвитком раку сечового міхура та метастазуванням пухлини аналізували за допомогою бінарної логістичної регресії. Визначали відношення шансів (OR) і 95 % довірчий інтервал (95 % CI) в домінантній (носії мінорного алеля проти домінантних гомозигот), рецесивній (гомозиготи за мінорним алелем проти носіїв домінантного алеля), наддомінантній (гетерозиготи проти гомозигот) та адитивній (гетерозиготи та гомозиготи за рецесивним алелем проти гомозигот за основним алелем) моделях спадкування. Застосування мультиваріабельної логістичної регресії дало змогу зробити поправки на інші фактори ризику – вік, стать, звичку курити та зловживати алкоголем. Усі тести були двобічними. Значення $p > 0,05$ вважали статистично значущим.

Результати

Основні клінічні характеристики хворих на ПКРСМ і представників контрольної групи наведені в таблиці 1. Особи контрольної групи виявилися значно старшими за пацієнтів з онкологічною патологією ($p < 0,001$). Натомість серед хворих на ПКРСМ кількість курців виявилася

значущо більшою, ніж серед здорових осіб ($p < 0,001$). Встановили статистично вірогідні відмінності розподілу представників груп порівняння за статтю ($p = 0,009$).

У таблиці 4 узагальнені результати порівняння частот алелів і генотипів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* серед пацієнтів із ПКРСМ та осіб контрольної групи. Встановили, що частоти алелів у групі контролю відповідають рівновазі Харді-Вайнберга ($p_{HWE} = 0,862$). Статистично значущі відмінності розподілу як алелів ($p = 0,296$), так і генотипів ($p = 0,55$) між групами порівняння не встановили.

Результати аналізу зв'язку генотипів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* із розвитком ПКРСМ наведені в таблиці 5. Статистично значущі результати як за даними бінарної логістичної регресії, так і після врахування поправок на вік, стать і звичку курити не встановили ($p_{сност} > 0,05$ та $p_{пор} > 0,05$ в усіх моделях спадкування).

Для дослідження зв'язку між генотипами за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* і метастатичним потенціалом ПКРСМ онкологічну групу поділили на 2: в першу ввійшли пацієнти з метастатичними вогнищами, у другу – особи без метастазів. Клінічні характеристики груп порівняння узагальнені в таблиці 2. Виявилось,

що серед пацієнтів без метастазів кількість хворих, які зловживають алкоголем, статистично більша, ніж серед осіб із метастазами ($p = 0,021$). Відмінності за віком, статтю пацієнтів і кількістю курців не визначили ($p > 0,05$).

У таблиці 6 наведені результати порівняння частот алелів і генотипів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* серед осіб із метастазами та без них. Не встановили статистично значущі відмінності за розподілом як алелів ($p = 0,055$), так і генотипів ($p = 0,104$).

Результати аналізу зв'язку rs1899663-поліморфізму гена *HOTAIR* із розвитком метастазування ПКРМ наведені в таблиці 7. Встановили, що ризик розвитку метастазування в носіїв ТТ-генотипу менший, ніж у носіїв G-алеля ($p_{\text{спост}} = 0,047$; $OR_{\text{спост}} = 0,334$, 95 % CI = 0,113–0,986) відповідно до рецесивної моделі спадкування. За даними адитивної моделі, ризик розвитку метастазування ПКРМ в осіб із ТТ-генотипом менший, ніж у гомозигот за основним алелем ($p_{\text{спост}} = 0,04$; $OR_{\text{спост}} = 0,301$, CI = 0,096–0,944). Однак після застосування поправок на вік, стать, куріння та зловживання алкоголем статистично значущий зв'язок зник як у рецесивній ($p_{\text{попр}} = 0,09$; $OR_{\text{попр}} = 0,386$, 95 % CI = 0,129–1,159), так і в адитивній ($p_{\text{попр}} = 0,076$; $OR_{\text{попр}} = 0,348$, CI = 0,108–1,118) моделях спадкування.

Обговорення

Ген *HOTAIR* має довжину 12,649 пн, його кодувальний ланцюг входить до складу мінус-ланцюга довгого плеча 12q13.13 хромосоми (NC_000012.12). За даними GRCh38.p7 (Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 12), трасверсія G→T (rs1899663) локалізується на мінус-ланцюгу хромосоми в положенні 53,967,210. Відзначимо, що референсна послідовність NC_000012.12 відповідає 5'-3'-послідовності нуклеотидів некодувального ланцюга гена *HOTAIR* (і, відповідно, частині послідовності змістовного ланцюга гена *HOXC11*), тому в деяких джерелах поліморфний варіант rs1899663 розглядають як заміну C→A на плюс-ланцюга хромосоми.

У результаті дослідження встановили такі частоти мінорного Т-алеля: у представників контрольної групи – 0,405; у групі пацієнтів із ПКРМ – 0,358; у хворих, які мають метастази пухлини, – 0,301; у групі без метастазів – 0,411. Частоти алелів у групі контролю відповідають рівновазі Харді–Вайнберга, а статистично вірогідні відмінності за розподілом алелів і генотипів між групами порівняння не встановили. За даними The 1000 Genomes Project (phase 3), частота мінорного А-алеля за rs1899663-поліморфізмом у загальній популяції становить 0,254, серед африканців – 0,179, в американській популяції – 0,362, серед населення Східної Азії – 0,205, серед представників південної Азії – 0,314, серед європейців – 0,268. Найбільш зіставна з контрольною групою частота мінорного алеля виявлена у популяції колумбійців (Медельїн) – 0,409, перуанців (Ліма) – 0,4, мексиканців (Лос-Анджелес) – 0,383 [15]. Результати свідчать про наявність етнічних особливостей у розподілі rs1899663-поліморфних варіантів гена *HOTAIR*. Однак нині це перші дані щодо частоти мінорного Т-алеля серед хворих на рак сечового міхура як для української, так і світової популяції.

Таблиця 4. Розподіл алелів і генотипів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* серед хворих на ПКРМ та осіб групи контролю

Генотипи	ПКРМ (n = 141)		Контроль (n = 100)		p_{HWE}	p
	n	%	n	%		
GG	59	41,8	35	35,0	–	0,550
GT	63	44,7	49	49,0		
TT	19	13,5	16	16,0		
Алелі						
G	181	64,2	119	59,5	0,862	0,296
T	101	35,8	81	40,5		

ПКРМ: перехідноклітинний рак сечового міхура; **n:** кількість осіб; **p_{HWE} :** показник відхилення частот алелів від рівноваги Харді–Вайнберга; **p:** показник статистичної значущості.

Таблиця 5. Аналіз зв'язку rs1899663-поліморфних варіантів гена *HOTAIR* із розвитком ПКРМ

Модель	$p_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$p_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)
Домінантна	0,284	0,748 (0,441 – 1,271)	0,334	0,764 (0,442 – 1,319)
Рецесивна	0,584	0,818 (0,398 – 1,681)	0,607	0,823 (0,391 – 1,731)
Наддомінантна	0,508	0,841 (0,503 – 1,405)	0,561	0,855 (0,503 – 1,452)
Аддитивна ^a	0,382	0,704 (0,321 – 1,545)	0,421	0,717 (0,319 – 1,613)
	0,344	0,763 (0,435 – 1,336)	0,397	0,779 (0,437 – 1,388)

ПКРМ: перехідноклітинний рак сечового міхура; **$p_{\text{спост}}$:** значення p без поправки на коваріати; **$OR_{\text{спост}}$:** відношення шансів; **$p_{\text{попр}}$:** значення p після поправки на вік, стать і звичку палити; **$OR_{\text{попр}}$:** відношення шансів після поправки на коваріати; **95 % CI:** 95 % довірчий інтервал; верхній рядок показує результати порівняння ТТ-генотипу з GG-генотипом, а нижній – GT-генотипу з GG-генотипом.

Таблиця 6. Розподіл алелів і генотипів за rs1899663-поліморфізмом гена *HOTAIR* серед хворих на ПКРМ із метастазуванням і без нього

Генотипи	З метастазами (n = 68)		Без метастазів (n = 73)		p
	n	%	n	%	
GG	32	47,1	27	37	0,104
GT	31	45,6	32	43,8	
TT	5	7,4	14	19,2	
Алелі					
G	95	69,9	86	58,9	0,055
T	41	30,1	60	41,1	

ПКРМ: перехідноклітинний рак сечового міхура; **n:** кількість осіб; **p:** показник статистичної значущості.

Таблиця 7. Аналіз зв'язку rs1899663-поліморфізму гена *HOTAIR* із розвитком метастазування ПКРМ

Модель	$p_{\text{спост}}$	$OR_{\text{спост}}$ (95 % CI)	$p_{\text{попр}}$	$OR_{\text{попр}}$ (95 % CI)
Домінантна	0,227	0,66 (0,337 – 1,294)	0,283	0,68 (0,336 – 1,375)
Рецесивна	0,047	0,334 (0,113 – 0,986)	0,09	0,386 (0,129 – 1,159)
Наддомінантна	0,834	1,073 (0,552 – 2,086)	0,884	1,053 (0,526 – 2,109)
Аддитивна ^a	0,04	0,301 (0,096 – 0,944)	0,076	0,348 (0,108 – 1,118)
	0,579	0,817 (0,401 – 1,665)	0,602	0,82 (0,39 – 1,727)

ПКРМ: перехідноклітинний рак сечового міхура; **$p_{\text{спост}}$:** значення p без поправки на коваріати; **$OR_{\text{спост}}$:** відношення шансів; **$p_{\text{попр}}$:** значення p після поправки на вік, стать, звичку палити та зловживання алкоголем; **$OR_{\text{попр}}$:** відношення шансів після поправки на коваріати; **95 % CI:** 95 % довірчий інтервал; верхній рядок показує результати порівняння ТТ-генотипу з GG-генотипом, а нижній – GT-генотипу з GG-генотипом.

Поліморфний варіант rs1899663 гена *HOTAIR* локалізується в інтроні (положення 4903 за даними NC_000012.12). Відомо 3 транскрипційні варіанти *HOTAIR*, що утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу. Серед них транскрипційний варіант 2 (NR_003716.3), довжиною 2364 нуклеотиди, є найбільш

дослідженням. Встановлено, що rs1899663-поліморфізм знаходиться у другому інтроні (3'-кінець попереднього екзону 2 закінчується нуклеотидом 266, рахуючи від сайту ініціації транскрипції) та має порядковий номер 59 (відлік проводиться від першого нуклеотиду 5'-кінця інтрона 2), що позначається 266+59G>T (NR_003716.3). Gong et al [16] з'ясували: трансверсія G→T (rs1899663) призводить до зміни мінімальної вільної енергії (ΔG) на 7,8 ккал/моль у центральній ділянці HOTAIR, що може впливати на вторинну структуру молекули. У подальшому Taheri et al встановили, що заміна G на T (rs1899663) змінює спорідненість HOTAIR до транскрипційних факторів HNF4, PPAR та RXRA, що пов'язані з прогресією та рецидивуванням багатьох пухлин, зокрема раку сечового міхура [17–19].

Велика кількість досліджень спрямована на з'ясування ролі поліморфних варіантів гена HOTAIR у розвитку пухлинних процесів. Min et al [20] здійснили метааналіз 18 джерел фахової літератури, відповідно до якого носії ТТ-генотипу за rs12826786 і rs920778 поліморфними варіантами гена HOTAIR мають підвищений ризик виникнення ракових захворювань порівняно з носіями основного С-алеля. Жодних статистично значущих результатів для rs7958904, rs4759314, rs874945 і rs1899663 однонуклеотидних поліморфізмів не виявили. Метааналіз 48 досліджень, що здійснений Li et al [21], підтверджує наведені дані: дослідники виявили значущий зв'язок між rs920778 і rs12826786 поліморфізмами гена HOTAIR і пухлинною трансформацією клітин, однак для rs1899663, rs874945 і rs4759314 поліморфізмів таку закономірність не встановили. Ризик виникнення онкологічних захворювань травної системи в носіїв мінорного С-алеля за rs7958904-поліморфізмом гена HOTAIR виявився нижчим порівняно з носіями основного G-алеля у представників китайської популяції.

Слід відзначити, що результати більшості наукових пошуків стосуються дослідження впливу rs1899663-поліморфних варіантів гена HOTAIR на пухлинну трансформацію тканин, що чутливі до впливу статевих гормонів. Taheri et al [17] встановили, що носії Т-алеля за rs1899663-поліморфізмом мають підвищений ризик розвитку доброякісної гіперплазії передміхурової залози в іранській популяції. До того ж такі особи мають більшу схильність до ракового переродження гіперплазованих клітин надалі. Hassanzarei et al [22] дійшли до висновку: носії Т-алеля за rs1899663-поліморфізмом мають знижений ризик виникнення раку молочної залози серед представників південно-східного регіону Ірану. Зіставні результати отримали дослідники Yan et al [23] для китайської популяції, встановивши протективний ефект Т-алеля в розвитку раку молочної залози серед жінок із віком настання менархе понад 14 років і більш ніж двома вагітностями. Натомість Weng et al [24] показали відсутність зв'язку між rs1899663-поліморфними варіантами та виникненням цервікальної інтраепітеліальної неоплазії в азіатських жінок, а Guo et al [25] не виявили статистично значущі відмінності за розподілом генотипів за rs1899663-поліморфізмом між хворими на рак шийки матки та особами групи контролю серед представників китайської популяції.

Інша група сучасних досліджень спрямована на встановлення ролі rs1899663-поліморфізму гена

HOTAIR у розвитку пухлин травної системи. Так, Li et al [26] не встановили статистично вірогідний зв'язок між rs1899663-поліморфізмом і виникненням гепатоцелюлярної карциноми в китайського населення. Su et al [27] встановили підвищений ризик розвитку плоскоклітинного раку ротової порожнини у носіїв ТТ-генотипу за rs1899663-поліморфізмом після врахування поправок на куріння, жування бетеля та зловживання алкоголем серед представників Східно-Азійського регіону. До того ж виявлена закономірність зберігалася під час порівняння групи хворих, які не використовують бетель, і контрольних осіб із поправками на куріння та зловживання алкоголем.

Деякі наукові робіт присвячені аналізу зв'язку між rs1899663-поліморфними варіантами та виникненням пухлин дихальної та нервової систем. Так, Wang et al [28] встановили, що носії ТТ-генотипу мають вищий ризик розвитку раку легень порівняно з носіями GG-генотипу в китайській популяції. Gong et al [16] повідомляють про більшу чутливість до хіміотерапії в китайських пацієнтів із раком легень, що мають Т-алель. Yang et al [29] знайшли статистично значущий зв'язок між наявністю AA-генотипу за rs1899663-поліморфізмом і підвищеним ризиком розвитку нейроblastоми в дітей китайської популяції. Після стратифікаційного аналізу науковці встановили, що отримана закономірність виявляється у групі жінок, а також серед пацієнтів із первинною локалізацією пухлини в заочеревинному просторі чи середостінні.

Отже, вплив rs1899663-поліморфізму на розвиток онкологічної патології значуще відрізняється в різних етнічних групах. Результати здійсненого дослідження свідчать про відсутність зв'язку між rs1899663-поліморфізмом гена HOTAIR і розвитком ПКРСМ в українській популяції. Встановили, що носії ТТ-генотипу мають вищий ризик метастазування пухлини порівняно з носіями G-алеля. Проте після внесення в рівняння логістичної регресії поправок на вік, стать, куріння та зловживання алкоголем виявлений зв'язок втратив статистичну значущість. Це свідчить про наявність поряд із генотипом важливіших предикторів метастатичного потенціалу пухлини.

Подібне дослідження щодо зв'язку між rs1899663-поліморфізмом гена HOTAIR і розвитком ПКРСМ у світі не здійснювали, а результати, що одержали, є першими для української популяції.

Висновки

1. Уперше встановили розподіл алелів за rs1899663-поліморфним сайтом гена HOTAIR у представників української популяції.
2. В українській популяції відсутній зв'язок між rs1899663-поліморфізмом гена HOTAIR і виникненням раку сечового міхура.
3. Поліморфний локус rs1899663 гена HOTAIR не впливає на розвиток метастазування в українських пацієнтів із раком сечового міхура.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 05.03.2019

Після доопрацювання / Revised: 11.04.2019

Прийнято до друку / Accepted: 24.04.2019

Відомості про авторів:

Волкогон А. Д., канд. мед. наук, асистент каф. хірургії та онкології медичного інституту, Сумський державний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0003-0835-0657

Чумаченко Я. Д., лаборант наукової лабораторії молекулярно-генетичних досліджень, Сумський державний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4803-5435

Гарбузова В. Ю., д-р біол. наук, професор каф. фізіології та патофізіології з курсом медичної біології медичного інституту, зав. наукової лабораторії молекулярно-генетичних досліджень, Сумський державний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-7183-6997

Атаман О. В., д-р мед. наук, професор каф. фізіології та патофізіології з курсом медичної біології медичного інституту, Сумський державний університет, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-1941-740X

Сведения об авторах:

Волкогон А. Д., канд. мед. наук, ассистент каф. хирургии и онкологии медицинского института, Сумский государственный университет, Украина.

Чумаченко Я. Д., лаборант Научной лаборатории молекулярно-генетических исследований, Сумский государственный университет, Украина.

Гарбузова В. Ю., д-р биол. наук, профессор каф. физиологии и патофизиологии с курсом медицинской биологии медицинского института СумГУ, зав. научной лабораторией молекулярно-генетических исследований, Сумский государственный университет, Украина.

Атаман А. В., д-р мед. наук, профессор каф. физиологии и патофизиологии с курсом медицинской биологии медицинского института, Сумский государственный университет, Украина.

Information about authors:

Volkohon A. D., MD, PhD, Assistant of the Surgery and Oncology Department, Medical Institute, Sumy State University, Ukraine.

Chumachenko Ya. D., Laboratory Assistant of the Scientific Laboratory of Molecular Genetic Studies, Sumy State University, Ukraine.

Harbuzova V. Yu., PhD, DSc, Professor of the Physiology and Pathophysiology Department with Medical Biology Course of Medical Institute of Sumy State University, Head of Scientific Laboratory of Molecular Genetic Research, Sumy State University, Ukraine.

Ataman O. V., MD, PhD, DSc, Professor of the Physiology and Pathophysiology Department with Medical Biology Course of Medical Institute, Sumy State University, Ukraine.

Список літератури

- [1] Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study / Vos T. et al. *The Lancet*. 2016. Vol. 388. Issue 10053. P. 1545-1602. doi: 10.1016/s0140-6736(16)31678-6
- [2] Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*. 2017. Vol. 3. Issue 4. P. 524-548. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5688
- [3] Motofei I. Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Investigation*. 2018. Vol. 36. Issue 5. P. 309-317. doi: 10.1080/07357907.2018.1477955
- [4] Dawson M., Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012. Vol. 150. Issue 1. P. 12-27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013
- [5] Li E., Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*. 2014. Vol. 6. Issue 5. a019133. doi: 10.1101/cshperspect.a019133

- [6] Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer / E. S. Martens-Uzunova et al. *European Urology*. 2014. Vol. 65. Issue 6. P. 1140-1151. doi: 10.1016/j.eururo.2013.12.003
- [7] Computational approaches towards understanding human long non-coding RNA biology / S. Jalali, et al. *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31. Issue 14. P. 2241-2251. doi: 10.1093/bioinformatics/btv148
- [8] Hajjari M., Salavaty A. HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biology & Medicine*. 2015. Vol. 12. Issue 1. P. 1-9. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0006
- [9] HOTAIR: a key regulator in gynecologic cancers / J. Li et al. *Cancer Cell International*. 2017. Vol. 17. Issue 65. doi: 10.1186/s12935-017-0434-6
- [10] HOTAIR: a cancer-related long non-coding RNA / B. Cai et al. *Neoplasma*. 2014. Vol. 61. Issue 4. P. 379-391. doi: 10.4149/neo_2014_075
- [11] Yu X., Li Z. Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015. Vol. 12. Issue 4. P. 5611-5618. doi: 10.3892/mmr.2015.4161
- [12] Analysis of the Polycomb-related lncRNAs HOTAIR and ANRIL in bladder cancer / M. Martínez-Fernández et al. *Clinical Epigenetics*. 2015. Vol. 7. Issue 109. doi: 10.1186/s13148-015-0141-x
- [13] Yu D., Zhang C., Gui J. RNA-binding protein HuR promotes bladder cancer progression by competitively binding to the long noncoding HOTAIR with miR-1. *Oncotargets And Therapy*. 2017. Vol. 10. P. 2609-2619. doi: 10.2147/ott.s132728
- [14] Long non-coding RNA HOTAIR regulates cyclin J via inhibition of microRNA-205 expression in bladder cancer / X. Sun et al. *Cell Death & Disease*. 2015. Vol. 6. e1907. doi: 10.1038/cddis.2015.269
- [15] A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015. Vol. 526. P. 68-74. doi: 10.1038/nature15393
- [16] Association of well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms with lung cancer susceptibility and platinum-based chemotherapy response / W. Gong et al. *Tumor Biology*. 2016. Vol. 37. Issue 6. P. 8349-8358. doi: 10.1007/s13277-015-4497-5
- [17] HOTAIR genetic variants are associated with prostate cancer and benign prostate hyperplasia in an Iranian population / M. Taheri et al. *Gene*. 2017. Vol. 613. P. 20-24. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.031
- [18] Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPARγ/RXRα in bladder cancer / M. Korpál et al. *Nature Communications*. 2017. Vol. 8. Issue. 103. doi: 10.1038/s41467-017-00147-w
- [19] Orphan nuclear receptor HNF4G promotes bladder cancer growth and invasion through the regulation of the hyaluronan synthase 2 gene / T. Okegawa et al. *Oncogenesis*. 2013. Vol. 2. e58. doi: 10.1038/oncsis.2013.25
- [20] The association between HOTAIR polymorphisms and cancer susceptibility: an updated systemic review and meta-analysis / L. Min et al. *Oncotargets And Therapy*. 2018. Vol. 11. P. 791-800. doi: 10.2147/ott.s151454
- [21] Long non-coding RNA HOTAIR polymorphism and susceptibility to cancer: an updated meta-analysis / J. Li et al. *Environmental Health And Preventive Medicine*. 2018. Vol. 23. Issue 8. doi: 10.1186/s12199-018-0697-0
- [22] Genetic polymorphisms of HOTAIR gene are associated with the risk of breast cancer in a sample of southeast Iranian population / S. Hassanzarei et al. *Tumor Biology*. 2017. Vol. 39. Issue 10. P. 1-8. doi: 10.1177/101042831772539
- [23] Polymorphisms in lncRNA HOTAIR and susceptibility to breast cancer in a Chinese population / R. Yan et al. *Cancer Epidemiology*. 2015. Vol. 39. Issue 6. P. 978-985. doi: 10.1016/j.canep.2015.10.025
- [24] Significant association of long non-coding RNAs HOTAIR genetic polymorphisms with cancer recurrence and patient survival in patients with uterine cervical cancer / S. Weng et al. *International Journal Of Medical Sciences*. 2018. Vol. 15. Issue 12. P. 1312-1319. doi: 10.7150/ijms.27505
- [25] Association of Long Non-Coding RNA HOTAIR Polymorphisms with Cervical Cancer Risk in a Chinese Population / L. Guo et al. *PLoS One*. 2016. Vol. 11. Issue 7. e0160039. doi: 10.1371/journal.pone.0160039
- [26] Association of Functional Genetic Variants of HOTAIR with Hepatocellular Carcinoma (HCC) Susceptibility in a Chinese Population / H. Li et al. *Cellular Physiology And Biochemistry*. 2017. Vol. 44. Issue 2. P. 447-454. doi: 10.1159/000485011
- [27] Impact of HOTAIR Gene Polymorphism and Environmental Risk on Oral Cancer / S. Su et al. *Journal Of Dental Research*. 2018. Vol. 97. Issue 6. P. 717-724. doi: 10.1177/0022034517749451
- [28] HOTAIR lncRNA SNPs rs920778 and rs1899663 are associated with smoking, male gender, and squamous cell carcinoma in a Chinese lung cancer population / C. Wang et al. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018. Vol. 39. Issue 11. P. 1797-1803. doi: 10.1038/s41401-018-0083-x
- [29] HOTAIR gene polymorphisms contribute to increased neuroblastoma susceptibility in Chinese children / X. Yang et al. *Cancer*. 2018. Vol. 124. Issue 12. P. 2599-2606. doi: 10.1002/cncr.31353

References

- [1] Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R., Bhutta, Z., & Brown, A. et al. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and

- years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053), 1545-1602. doi: 10.1016/s0140-6736(16)31678-6
- [2] Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R., Barregard, L., Bhutta, Z., & Brenner, H. et al. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*, 3(4), 524-548. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5688
- [3] Motofei, I. (2018). Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Investigation*, 36(5), 309-317. doi: 10.1080/07357907.2018.1477955
- [4] Dawson, M., & Kouzarides, T. (2012). Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*, 150(1), 12-27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013
- [5] Li, E., & Zhang, Y. (2014). DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 6(5), a019133-a019133. doi: 10.1101/cshperspect.a019133
- [6] Martens-Uzunova, E., Böttcher, R., Croce, C., Jenster, G., Visakorpi, T., & Calin, G. (2014). Long Noncoding RNA in Prostate, Bladder, and Kidney Cancer. *European Urology*, 65(6), 1140-1151. doi: 10.1016/j.euro.2013.12.003
- [7] Jalali, S., Kapoor, S., Sivadas, A., Bhartiya, D., & Scaria, V. (2015). Computational approaches towards understanding human long non-coding RNA biology. *Bioinformatics*, 31(14), 2241-2251. doi: 10.1093/bioinformatics/btv148
- [8] Hajjari, M., & Salavaty, A. (2015). HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer Biology & Medicine*, 12(1), 1-9. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0006
- [9] Li, J., Wang, J., Zhong, Y., Guo, R., Chu, D., Qiu, H., & Yuan, Z. (2017). HOTAIR: a key regulator in gynecologic cancers. *Cancer Cell International*, 17(65), doi: 10.1186/s12935-017-0434-6
- [10] Cai, B., Song, X., Cai, J., & Zhang, S. (2014). HOTAIR: a cancer-related long non-coding RNA. *Neoplasma*, 61(4), 379-391. doi: 10.4149/neo_2014_075
- [11] Yu, X., & Li, Z. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR: A novel oncogene (Review). *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5611-5618. doi: 10.3892/mmr.2015.4161
- [12] Martínez-Fernández, M., Feber, A., Dueñas, M., Segovia, C., Rubio, C., & Fernandez, M. et al. (2015). Analysis of the Polycomb-related lncRNAs HOTAIR and ANRIL in bladder cancer. *Clinical Epigenetics*, 7(109), doi: 10.1186/s13148-015-0141-x
- [13] Yu, D., Zhang, C., & Gui, J. (2017). RNA-binding protein HuR promotes bladder cancer progression by competitively binding to the long non-coding HOTAIR with miR-1. *Oncotargets And Therapy*, 10, 2609-2619. doi: 10.2147/ott.s132728
- [14] Sun, X., Du, P., Yuan, W., Du, Z., Yu, M., Yu, X., & Hu, T. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR regulates cyclin J via inhibition of microRNA-205 expression in bladder cancer. *Cell Death & Disease*, 6(10), e1907. doi: 10.1038/cddis.2015.269
- [15] A global reference for human genetic variation. (2015). *Nature*, 526, 68-74. doi: 10.1038/nature15393
- [16] Gong, W., Yin, J., Li, X., Fang, C., Xiao, D., & Zhang, W. et al. (2016). Association of well-characterized lung cancer lncRNA polymorphisms with lung cancer susceptibility and platinum-based chemotherapy response. *Tumor Biology*, 37(6), 8349-8358. doi: 10.1007/s13277-015-4497-5
- [17] Taheri, M., Habibi, M., Noroozi, R., Rakhshan, A., Sarrafzadeh, S., & Sayad, A. et al. (2017). HOTAIR genetic variants are associated with prostate cancer and benign prostate hyperplasia in an Iranian population. *Gene*, 613, 20-24. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.031
- [18] Korpala, M., Puyang, X., Jeremy Wu, Z., Seiler, R., Furman, C., & Oo, H. et al. (2017). Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nature Communications*, 8(103), doi: 10.1038/s41467-017-00147-w
- [19] Okegawa, T., Ushio, K., Imai, M., Morimoto, M., & Hara, T. (2013). Orphan nuclear receptor HNF4G promotes bladder cancer growth and invasion through the regulation of the hyaluronan synthase 2 gene. *Oncogenesis*, 2(7), e58. doi: 10.1038/oncsis.2013.25
- [20] Min, L., Mu, X., Tong, A., Qian, Y., Ling, C., Yi, T., & Zhao, X. (2018). The association between HOTAIR polymorphisms and cancer susceptibility: an updated systemic review and meta-analysis. *Oncotargets And Therapy*, 11, 791-800. doi: 10.2147/ott.s151454
- [21] Li, J., Cui, Z., Li, H., Lv, X., Gao, M., & Yang, Z. et al. (2018). Long non-coding RNA HOTAIR polymorphism and susceptibility to cancer: an updated meta-analysis. *Environmental Health And Preventive Medicine*, 23(8), doi: 10.1186/s12199-018-0697-0
- [22] Hassanzarei, S., Hashemi, M., Sattarifard, H., Hashemi, S., Bahari, G., & Ghavami, S. (2017). Genetic polymorphisms of HOTAIR gene are associated with the risk of breast cancer in a sample of southeast Iranian population. *Tumor Biology*, 39(10), 1-8. doi: 10.1177/1010428317727539
- [23] Yan, R., Cao, J., Song, C., Chen, Y., Wu, Z., Wang, K., & Dai, L. (2015). Polymorphisms in lncRNA HOTAIR and susceptibility to breast cancer in a Chinese population. *Cancer Epidemiology*, 39(6), 978-985. doi: 10.1016/j.canep.2015.10.025
- [24] Weng, S., Wu, W., Hsiao, Y., Yang, S., Hsu, C., & Wang, P. (2018). Significant association of long non-coding RNAs HOTAIR genetic polymorphisms with cancer recurrence and patient survival in patients with uterine cervical cancer. *International Journal Of Medical Sciences*, 15(12), 1312-1319. doi: 10.7150/ijms.27505
- [25] Guo, L., Lu, X., Zheng, L., Liu, X., & Hu, M. (2016). Association of Long Non-Coding RNA HOTAIR Polymorphisms with Cervical Cancer Risk in a Chinese Population. *PLoS One*, 11(7), e0160039. doi: 10.1371/journal.pone.0160039
- [26] Li, H., Tang, X., Liu, Y., Li, W., Chen, Q., & Pan, Y. (2017). Association of Functional Genetic Variants of HOTAIR with Hepatocellular Carcinoma (HCC) Susceptibility in a Chinese Population. *Cellular Physiology And Biochemistry*, 44(2), 447-454. doi: 10.1159/000485011
- [27] Su, S., Hsieh, M., Lin, C., Chuang, C., Liu, Y., Yeh, C., & Yang, S. (2018). Impact of HOTAIR Gene Polymorphism and Environmental Risk on Oral Cancer. *Journal Of Dental Research*, 97(6), 717-724. doi: 10.1177/0022034517749451
- [28] Wang, C., Li, Y., Li, Y., Zhang, H., Gong, H., & Yuan, Y. et al. (2018). HOTAIR lncRNA SNPs rs920778 and rs1899663 are associated with smoking, male gender, and squamous cell carcinoma in a Chinese lung cancer population. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(11), 1797-1803. doi: 10.1038/s41401-018-0083-x
- [29] Yang, X., He, J., Chang, Y., Luo, A., Luo, A., & Zhang, J. et al. (2018). HOTAIR gene polymorphisms contribute to increased neuroblastoma susceptibility in Chinese children. *Cancer*, 124(12), 2599-2606. doi: 10.1002/cncr.31353