

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ЗМІНИ У МЕТИЛЮВАННІ ДНК ГЕНІВ-СУПРЕСОРІВ ПУХЛИН ТА
ОНКОГЕНІВ, ПОВ'ЯЗАНІ ІЗ ВИЖИВАНІСТЮ ПАЦІЄТІВ З
МЕЛАНОМОЮ**

Допущено до захисту

«__»_____2025 р.

Завідуючий

кафедрою _____

Кваліфікаційна робота бакалавра
студентки кафедри молекулярної
біології та біотехнології

Грози Катерини Сергіївни

Оцінка «_____»

Голова ЕК

Науковий керівник:

Лебідь-Білецька К.М.

«__»_____2025 р.

к.б.н. доцент кафедри
молекулярної біології та
біотехнології

АННОТАЦІЯ

Об'єктом дослідження даної роботи є рівень метилювання CpG-сайтів у промоторних областях генів-супресорів пухлин та онкогенів у пацієнтів з меланомою. **Предмет дослідження** – зв'язок між епігенетичними змінами та виживаністю пацієнтів, з урахуванням вікових та клініко-генетичних характеристик.

Методи дослідження: біоінформатичний аналіз відкритих метиломних та клінічних даних з проєкту TCGA-SKCM; статистична обробка (моделі Каплана–Мейєра, пропорційних ризиків Кокса); нормалізація даних та побудова прогностичних моделей у середовищах Python і R; візуалізація результатів з використанням Tableau. Було також використано інструменти пояснюваного машинного навчання - SHAP-аналіз, який дав змогу не лише ідентифікувати CpG-сайти, які мали найбільший вплив на прогноз виживаності, але й зрозуміти, у яку міру конкретне значення ознаки обумовлює результат для окремого пацієнта, що значно підвищило інтерпретованість результатів.

У роботі розроблено інтегровану прогностичну модель виживаності пацієнтів з меланомою на основі рівнів метилювання ДНК, клінічних та демографічних змінних. Результати дослідження продемонстрували, що зміни у метилюванні певних CpG-сайтів корелюють із тривалістю життя пацієнтів з меланомою, що підтверджує ключову роль епігенетичних маркерів для розробки персоналізованих прогностичних моделей.

Ключові слова: меланома, метилювання ДНК, CpG-сайти, прогностична модель, виживаність, TCGA, біоінформатика, SHAP, ген-супресор, онкогени.

ЗМІСТ

ВТУП.....	
Розділ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	
1.1. Історія вивчення метилювання ДНК та сучасний стан проблеми	
1.2. Вікові аспекти процесів метилювання ДНК	
1.2.1. Вікові зміни метилювання ДНК у здорових клітинах.	
1.2.2. Метилювання ДНК та вікові захворювання.	
1.2.3. Вікові зміни метилювання та гени-супресори пухлин.	
1.3. Особливості розвитку меланоми з урахуванням вікових змін.....	
1.3.1. Клінічні типи меланоми.....	
1.3.3. Вікові молекулярно-біологічні зміни при меланомі.	
1.3.3.1. Мутації BRAF (V600E).	
1.3.3.2. Мутації NRAS.....	
1.3.3.3. Мутації NF1.	
1.3.3.4. Мутації Triple wild-type.	
1.4. Онтогенетичні характеристики метилювання ДНК у контексті онкогенезу	
1.4.1. Метилювання ДНК при розвитку меланоми.	
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	
2.1. Об'єкт і предмет дослідження.....	
2.3.1. Інтеграція та обробка даних:	
2.3.2. Методи статистичного аналізу:.....	
2.4. Прогностичне моделювання.....	
2.5. Візуалізація результатів	
2.6. Етичні аспекти	
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	
3.1. Підготовка даних	
3.1.1. Збір даних.....	
3.1.2. Попередня обробка.....	
3.2. Вибірковий аналіз.....	
3.2.1. Визначення cut-off.....	
3.3. Аналіз виживаності	
3.3.1 Аналіз Каплана–Мейєра	
3.3.2. Побудова моделі Кокса та оптимізація змінних	
3.4. Кореляційний аналіз.....	
3.5. Класифікаційна модель RandomForest	
3.5.1. Оптимізація моделі виживаності	

3.6. Інтерпретація моделі за допомогою Explainable AI	
ВИСНОВКИ.....	
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	
ДОДАТКИ	

ВТУП

Однією з найагресивніших форм раку шкіри є меланома, яка, незважаючи на відносно низьку поширеність, спричиняє понад 80% летальних випадків. Прогнозування перебігу меланоми залишається складним завданням, оскільки класичні клінічні маркери не завжди відображають гетерогенність пухлини та індивідуальні особливості пацієнта. Саме тому останніми роками зростає інтерес до епігенетичних маркерів, зокрема рівня метилювання ДНК, які можуть виступати ефективними предикторами виживаності.

Метилювання CpG-сайтів у промоторних областях генів-супресорів пухлин і онкогенів може відображати як наявність пухлинних змін, так і вікові епігенетичні процеси. У зв'язку з цим такі зміни розглядаються як потенційні індикатори перебігу хвороби. Відтак, практичне застосування виявлених епігенетичних маркерів у клінічній практиці є перспективним напрямком для вдосконалення персоналізованої медицини. Зокрема урахування рівня метилювання ДНК в онкогенах та генах-супресорів пухлин дозволяє точніше оцінити ризики для кожного пацієнта з урахуванням віку та інших клінічних характеристик.

Метою дослідження є оцінка рівня метилювання ДНК як потенційного біомаркера для прогнозування виживаності при меланомі у контексті вікової епігенетичної регуляції.

Завдання дослідження:

1. Провести фільтрацію та нормалізацію даних ДНК-метилювання для пацієнтів з меланомою на основі даних TCGA.
2. Визначити CpG-сайти, асоційовані з віком пацієнтів та клінічними характеристиками пухлин.

3. Провести кластеризацію пацієнтів за рівнями метилювання CpG-сайтів, визначити їхній зв'язок з показниками виживаності.

4. Побудувати прогностичну модель виживаності на основі епігенетичних маркерів та клінічних змінних.

Об'єкт дослідження: Рівень метилювання CpG-сайтів у промоторних зонах генів-супресорів пухлин та онкогенів у пацієнтів з меланомою.

Предмет дослідження: Зв'язок між змінами метилювання ДНК і показниками виживаності пацієнтів з урахуванням вікових і клініко-генетичних характеристик.

Методи дослідження: поетапний біоінформатичний аналіз відкритих метиломних та клінічних даних з проєкту TCGA-SKCM; зокрема нормалізація, фільтрація за CpG-сайтами та інтеграція з клінічними даними. Статистична обробка (моделі Каплана–Мейєра, пропорційних ризиків Кокса); нормалізація даних та побудова прогнозних моделей у середовищах Python і R; візуалізація результатів з використанням Tableau. У дослідженні також застосовувались інструменти explainable AI, зокрема SHAP-аналіз, для інтерпретації внеску окремих CpG-сайтів у прогностичну модель.

Розділ 1. ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Історія вивчення метилювання ДНК та сучасний стан проблеми

Метилювання ДНК вважається одним із найкраще вивчених механізмів епігенетичної спадковості, оскільки дозволяє клітині зберігати інформацію про стан геномної активності навіть після її поділу.

Уперше його було відкрито в 1925 році Джонсон і Когхіллом, коли вони ізолювали та кристалізували нуклеїнові кислоти з *Mycobacterium tuberculosis*. Вони намагалися виявити патогенну структуру цієї бактерії, одним з можливих кандидатів був 5-метилцитозин (5mC), який Джонсон зміг синтезувати *in vitro* попередньо. Завдяки мікроскопічному дослідженню кристалізованих нуклеїнових кислот, що були оброблені пікратом, вдалося відрізнити цитозин та 5mC[1].

У 1948 році Хотчкісс робив хроматографію ДНК з тимусу теляти використовуючи паперову хроматографію і отримавши результати він побачив малопомітні смужки біля основних смуг цитозину. Він припустив, що це може бути модифікація цитозину та назвав його «епі-цитозин», під час подальших досліджень було виявлено, що зв'язок «епі-цитозин» - цитозин має однаковий спектр поглинання та мобільність як зв'язок тимін - урацил. Провівши аналогію між структурами, Хотчкісс припустив, що «епі-цитозин» має таку ж структуру як тимін (5-метилурацил), а саме 5mC. В 1950 році Уайатт підтвердив наявність 5mC у ДНК ссавців, комах та рослин, при чому у великій кількості [2].

Протягом наступних років було визначено, що саме нуклеїнові кислоти є носіями генетичної інформації, відкрито та описану структуру ДНК, а згодом Сінсгаймер визначив, що 5-метилцитозин знаходиться в парі двох основ цитозин (C) і гуанін (G), ця пара має назву динуклеотид

СрG. Згодом з'ясувалося, що подібні метильовані пари зустрічаються не так часто в еукаріотів [1].

В період 1960 - 1969 років, вчені Лурія, Бертані та Вейгле проводили експеримент, у якому виявили, що різні родини бактеріофагів мають різну здатність інфікувати штами бактерій. Вони помітили, що ДНК бактеріофагів руйнувалася всередині клітини за допомогою специфічних ферментів, які згодом отримали назву - ендонуклеази рестрикції. Проте, було незрозуміло яким чином бактерії не руйнують власний генетичний матеріал, тому Арбер припустив існування системи рестрикції-модифікації, у якій вагому роль відіграє метилювання. До бактеріальної ДНК додаються хімічні мітки, метильні групи, за допомогою метилтрансфери, що унеможлиблює дію ферментів рестрикції [2].

Згодом, Біллен виявив зв'язок між метилюванням ДНК у бактерій та процесом її реплікації, під час експериментів з *Escherichia coli* він спостерігав, що ДНК метилюється на новосинтезованому "не модифікованому" ланцюгу одразу після проходження реплікаційної вилки. Однак, коли реплікація відбувалася в середовищі з недоліком метіоніну - донора метильних груп, це призводило до утворення неметилюваного ланцюга ДНК, що не міг слугувати матрицею для наступної реплікації та був схильний до ушкоджень [1].

У 1964 році вчені Сринівасан і Борець допустили, що в еукаріотів також може існувати механізм, подібний до бактеріального, у якому 5-метилцитозин (5mC) бере участь у забезпеченні різноманітності типів клітин. Через 4 роки вони провели дослідження активності ДНК-метилтрансфераз у ядерних екстрактах різних тканин ембріональних та дорослих щурів, а також оцінили їхню здатність до метилювання ДНК різних типів. Ґрунтуючись на цих спостереженнях, вчені зробили висновок про те, що різні тканини одного і того ж організму можуть мати різний рівень вмісту 5mC [1].

У 1970-х роках Ванюшин виміряв рівень 5mC у різних організмах за допомогою мас-спектрометрії, зокрема губок, молюсків, риб, рептилій і ссавців. У ході експерименту було виявлено, що кількість 5mC у ДНК може змінюватися між видами, але у близькоспоріднених організмів вона зазвичай подібна [1].

Невдовзі після відкриття ендонуклеаз рестрикції Арбером, їх було вперше виділено з *Escherichia coli* та *Haemophilus influenzae*. Одним із таких ферментів став HpaII, але у 1978 році було опубліковано декілька досліджень, де HpaII поведився не характерно до першовідкритого, виявилось, що це його ізошизомер - MspI. Їх різниця полягала в тому, що HpaII розрізає лише неметильовану ділянку CCGG, а MspI ріже незалежно від метилювання. Завдяки чому стало можливо визначати ділянки ДНК, що метильовані і які ні: Якщо HpaII не ріже, а MspI ріже, це означає, що цитозин у CpG метильований. У тому разі якщо обидва ріжуть, то ДНК неметильована [1].

Подальші дослідження показали, що метилювання пригнічує експресію генів, і вчені дійшли до висновку, що 5mC є репресивною модифікацією, яка блокує активність певних генів.

В кінці 1970-х років було відкрито сполуку 5-Азациитидин (5-aza), нуклеозидний аналог цитозину, мутаген та один з перших протиракових препаратів. У ході експериментів було визначено, що ця речовина може пригнічувати активність ДНК-метилтрансфераз, а також є індуктором диференціації клітин [3].

У період з 1970-х до 1980-х років був активний розвиток трансгенних технологій та методів клонування *in vitro* та *in vivo*. Завдяки цим методам Бьорд та його колеги визначили, що 5mC розподіляється у геномах хребетних та безхребетних за принципом "all or none", тобто метильовані та неметильовані ділянки займають різні частини хроматин. У ході

дослідження було визначено, що деметилювання може призвести до активації генів, проте це відбувається не завжди, і навіть більше - метильовані гени можуть бути активними. Тобто, репресія генів має значно складніший та комплексний механізм регуляції. Також вчені дійшли до того, що має існувати механізм активного деметилювання, але не змогли ідентифікувати які ферменти відповідають за це.

Jaenisch і колеги були зацікавлені у вивченні регуляції вірусних генів за допомогою метилювання. Провівши експерименти на мишах, що мали гермінальні (спадкові) копії вірусу лейкемії Молоні (M-MuLV), вони виявили, що неметильовані копії вірусу (M-MuLV) активуються та інфікують клітини після трансфекції, на відміну від ендогенних метильованих копій, які залишаються неактивними. Вони також встановили, що у доімплантаційних ембріонах мишей вірусні послідовності швидко метилюються та інактивуються, а в післяімплантаційних ембріонах цей процес не відбувається.

Базуючись на результатах Jaenisch, Niwa та інші вчені експериментально показали, що застосування 5-азацитидину на метильованих ділянках не призводить до активації вірусу в ембріональних карциномах, за умови, що ці клітини не були ще диференційовані. Однак, коли ці ЕС-клітини спочатку були диференційовані, 5-азацитидин призводив до активації вірусу. Так вчені дійшли до двох висновків:

1. Ранній розвиток: не залежить від метилювання ДНК.
2. Пізній розвиток: метилювання має велике значення для регуляції генів.

Бьорд визначив, що певні ділянки ДНК мають велику концентрацію CpG і не є метильованими, знаходяться в активних генах. Згодом ці ділянки отримали назву острови CpG, і вони відіграють важливу роль в регуляції генів, бо оточені білками, що перешкоджають їх метилюванню. Крім того,

вчені відкрили білковий комплекс MeCP1, який зв'язується з метильованими ділянками ДНК.

У 1987 році Монк досліджував метилювання ДНК на різних періодах розвитку мишей, він визначив, що ДНК ооцитів мало метильована, у той час як у сперматозоїдів вона високо метильована. Після утворення зиготи рівень метилювання досягає мінімуму, потім, під час гастрულляції, ДНК зародку поступово накопичує метилювання. Це вирішальний етап розвитку, адже саме тоді визначаються активні та неактивні гени.

Через рік Бестор та інші вчені виконали перше клонування ссавцевої ДНК-метилтрансферази (Dnmt1), завдяки чому було виявлено еволюційний консерватизм метилтрансфераз та суттєвість специфічності послідовностей ДНК для приєднання метилтрансферази.

Бьорд продовжував дослідження островів CpG і в 1990 році він побачив, що певні CpG острови можуть аномально сильно метилюватися при культивуванні *in vitro*. Це змусило його припустити, що існує механізм, який захищає CpG острови від метилювання в організмі.

В 1992 році у лабораторії Яеніша було проведено експеримент, під час якого у мишей блокувалася активність гену Dnmt1, у результаті кількість метильованої ДНК значно знизилась як в *in vivo*, та і в *in vitro*. У недиференційованих стовбурових клітинах ембріона миші, що не мали активного Dnmt1, були наявні ознаки життя, однак як тільки ці клітини почали диференціюватися, їхній розвиток зупинявся, і вони гинули. При введенні нормального гену Dnmt1 і мишей, рівень метилювання ДНК відновився, проте не вдалося поновити "імпринтоване метилювання", що пов'язане з явищем генетичного імпринтингу [4].

Втім, навіть після блокування гену Dnmt1, метилювання ДНК все ще відбувалося, тому вчені припустили, що існують інші ферменти, які мають таку функцію. Вони знали, що каталізуючі домени різних бактеріальних

цитозин-метилтрансфераз мають високу гомологію між собою та з Dnmt1, і тоді за допомогою гомології були виявлені інші ферменти, які можуть метилювати ДНК, а саме, Dnmt3a і Dnmt3b, найбільшу активність вони проявляють у стовбурових клітинах.

У 1993 році лабораторія Робертса опублікувала першу кристалічну структуру ДНК-метилтрансферази M.HhaI, яка показала, як цей фермент переносить метильну групу на ДНК. Виявилося, що під час цього процесу як метилтрансфераза, так і ДНК змінюють свою конформацію. Для того, щоб докладно вивчити механізм перенесення метильної групи вчені замінили водень на фтор.

У першій половині 1990-х років Бьорд досліджував механізми транскрипції, його експеримент показав, що метильовані промотори транскрибуються аналогічно неметильованим, за умови ослаблення зв'язку між MeCP1 та метильованої ДНК, або за низької концентрації MeCP1. Тому Бьорд запропонував гіпотезу, що метилювання не блокує транскрипцію, а слугує посередником між білком MeCP1 і метильованими CpG-сайтами.

Через рік було виявлено MeCP2, який здатний зв'язуватися з одинарним метильованим CpG, найбільша його концентрація знаходиться в перицентромерному гетерохроматині. Він здатен зв'язуватися з іншими білками для пригнічення транскрипції, наприклад, з гістондеацетилазою. Було також виявлено інші білки з подібною функцією, але вони мають вузьку специфіку функціонування в клітинах.

У кінці 1990-х було проведено багато досліджень механізму метилювання ДНК у рослин, вчені виявили, що у рослин наявні 3 сновні класи ДНК-метилтрансфераз: MET1, CMT та DRM. MET1 є аналогом DNMT1 у ссавців, тобто виконує функцію збереження метилювання CpG. CMT відповідає за метилювання повторюваних елементів та регулює

ремоделювання хроматину. DRM відрізняється за будовою та виконує метилювання нових фрагментів ДНК.

В 1997 році була опублікована стаття де лабораторія Бестора стверджувала, що однією з головних функцій метилювання ДНК є пригнічення мобільних генетичних елементів, транспозонів. У ході свого експерименту, вони показали, що у мишей із нокаутом гена *Dnmt1* відбулася масова експресія ІАР-ретротранспозонів, що вказувало на кореляцію між метилюванням і контролем транспозонів.

Однак цього ж року вчений Бьорд піддав цю гіпотезу критиці через недолік даних. Він також зазначив, що статеві клітини можуть використовувати інші механізми пригнічення транспозонів.

На початку 2000-х років було завершено декілька проектів з секвенування геномів людини та миші, що стало важливою базою для розвитку вчень про метилювання ДНК.

Немаловажним дослідженням було визначення ролі 5mC у експресії імунопринтованих генів. Експеримент проводився на *Igf2* (інсуліноподібний фактор росту 2) і *H19*, генах, що зосереджені один біля одного на хромосомі, проте *Igf2* активний тільки з батьківської алелі, а *H19* — тільки з материнської. Вони мають протилежну експресію, яка регулюється спеціальною послідовністю - контрольною ділянкою імпринтингу (ICR). Такий вид регуляції називається генний імпринтинг і саме метилювання ICR регулює, який із генів буде активним. Якщо ICR неметилований, у нормі на материнській алелі, білок CTCF здатний зв'язуватися з цією ділянкою. Цей процес створює бар'єр, який запобігає взаємодії енхансера з геном *Igf2*. У результаті, ген *H19* активується і починає експресуватися. У випадку, коли ICR метильований, батьківська алель, білок CTCF не може зв'язатися з ICR. За відсутності цього бар'єру,

енхансер отримує можливість стимулювати експресію Igf2, тоді як ген H19 залишається неактивним.

Це провідне відкриття, яке дало змогу зрозуміти, що метилювання може впливати не тільки на промотори, а й на регуляторні елементи геному опосередковано. Іншими словами, епігенетичні зміни можуть змінювати тривимірну структуру хроматину, впливаючи на активацію або блокування генів.

У 2001 році Тамару та Селкер визначили, що ген *dim-5* у грибка *Neurospora crassa* відповідає за нормальне метилювання ДНК і кодує фермент, який каталізує метилювання лізину 9 у гістоні H3 (H3K9). Якщо ця мітка змінювалася або видалялася, то рівень метилювання ДНК знижувався. Таким чином виникла гіпотеза, що певні модифікації гістонів можуть впливати на роботу еукаріотичних ДНК-метилтрансфераз, спрямовуючи їхню дію.

Згодом Джексон підтвердив що цей принцип також працює у рослин, він показав, що ген *KRYPTONITE* додає H3K9-метильні мітки, а ДНК-метилтрансфераза *CMT3* використовує їх як орієнтир для свого метилювання. Окрім цього, його команда знайшла білок *LHP1* (гомолог *HP1* – у тварин), який розпізнає ці гістонові мітки і допомагає процесу метилювання ДНК. Завдяки чому було створено універсальний механізм регуляції метилювання ДНК через гістонові мітки.

У 2001 році вчені виявили, що білок DNMT3L допомагає іншим ферментам в метилюванні ДНК та грає вирішальну роль у генетичному імпринтингу. Подальше дослідження білка показало, що він може зв'язуватися з ферментами DNMT3A та DNMT3B, а також із білком гістону H3, але якщо H3 містить метильовану H3K4, то зв'язок із DNMT3L блокується. Паралельно з цим було відкрито білок UHRF1, який допомагає DNMT1 підтримувати метилювання. UHRF1 ідентифікує і

зв'язується з ДНК, яка вже наполовину метильована, і залучає DNMT1, щоб завершити метилювання. Якщо ген білка UHRF1 “вимкнути”, то метилювання майже повністю зникне.

Завдяки цим дослідженням була створена гіпотеза Геникоффа та Якобсена, яка стверджує, що під час реплікації ДНК, коли материнська нитка ДНК служить матрицею для синтезу дочірньої нитки, фермент DNMT1 зчитує патерн метилювання зі старої нитки та копіює його на нову.

DNMT3A та DNMT3B необхідні для нормального функціонування репродуктивної системи, оскільки вони беруть участь у регуляції експресії генів, задіяних у гаметогенезі та розвитку ембріона.

У середині 2000-х років були створені перші карти метилювання для геному *Arabidopsis*, на них було показано, що 5'-кінці генів майже не мають метилювання CpG, тіла активних генів містять високий рівень метилювання, але частота CpG менша.

Паралельно лабораторії Бестора та Шюбелера створили перші детальні карти метилювання ДНК у людини, де підтвердили, що промоторні CpG-острівці в основному залишаються неметильованими в нормальних клітинах, але в клітинах раку були виявлені гіперметильовані CpG-острівці.

Дослідження, проведені в лабораторії Еккера, виявили, що в іморталізованих клітинах зменшився рівень метилювання CpG-ділянок у значних регіонах геному. Однак близько 40% генома в таких клітинах складають частково метильовані домени (PMDs). Це спостереження є вирішальним для дослідження процесів старіння та розвитку раку.

У 2006 році Саксонов та його колеги завершили комп'ютерний аналіз людського геному, що виявив два типи промоторів: з низькою (LCG, 30% промоторів) і високою (HCG, 70% промоторів) густиною CpG. LCG промотори часто є метильованими, але вони пов'язані з генами, що активні

та транскрибуються. А H3G промотори - неметильовані, хоча можуть і не працювати, проте це є провідним фактором для генів статевих клітин, у соматичних клітинах, бути метильованими для повної блокади. До того ж, неметильовані промотори часто містять велику кількість метильованих гістонів H3K4, що може бути захисним механізмом від метилювання ДНК.

Через 3 роки було виявлено, що ферменти TET1, TET2 та TET3 є ключовими для активного деметилювання, вони перетворюють метильовані цитозини (5mC) в 5-гідроксиметилцитозин (5hmC). Ці ферменти відіграють головну роль в регуляції генної експресії: диференціації клітин та підтримці плюрипотентності стовбурових клітин. Було також виявлено високу концентрацію 5hmC в нейронах, де бере участь в нейрогенезі, формуванні нервових зв'язків та довготривалої пам'яті. У пухлинах переважає пасивний механізм деметилювання у комбінації з втратою активності TET-білків, це може призвести до дестабілізації геному та прогресії пухлин [5]. Зміни у рівнях 5hmC в нейронах також пов'язують з нейродегенеративними захворюваннями, такими як хвороба Альцгеймера та хвороба Паркінсона.

На початку 2010-х років було виявлено короткі низькометильовані ділянки (LMRs) у різних типах тканин, вони мають специфічні ділянки для зв'язування з транскрипційними факторами (TFs) і змінюються у ході диференціації. Також вчені визначили, що 90% TFs можуть змінювати здатність зв'язуватися з ДНК в залежності від метилювання. Наприклад, FOXA2 здатний ініціювати часткове деметилювання для кращого доступу інших білків.

У 2013 році було відкрито долини метилювання ДНК (DMVs) - це довгі ділянки ДНК в яких міститься декілька CpG-острівців. Вони консервативні серед різних типів клітин і відіграють важливу роль у регуляції геному (плюрипотентність та диференціація) [1].

Вчений Го (Guo) продовжив дослідження DNMT та виявив, що DNMT3A та DNMT3B зв'язуються з H3-пептидом через консервативний ADD-домен, який реагує на рівень метилювання H3K4. Коли DNMT3A блокується метильованим H3K4, він залишається в автоінгібованій конформації та не може метилювати ДНК. DNMT1 має аналогічний механізм, проте зв'язується з UHRF1, який здатний виявляти напівметилювану ДНК і бере участь в збереженні епігенетичних міток після утворення дочірньої ДНК [6].

У 2010 році виявили, що H3K36-метилювання ініціює процес метилювання ДНК, було визначено маркер H3K36me3, який здатен зв'язуватися з DNMT3B через PWWP домен, а H3K36me2 з DNMT3A. Ці модифікації гістонів найчастіше зустрічаються в тілах активно транскрибованих генів, тому мають велике значення для експресії генів [6].

Через 6 років було вперше проведено редагування ДНК метилювання в геномі ссавців за допомогою CRISPR-Cas9. Дезактивований Cas9 об'єднали з каталізаторними доменами DNMT3A для спрямованого метилювання промоторів певних генів. Пізніше було створено комплекс з DNMT3A та TET1 для одночасного регулювання експресії генів шляхом метилювання та диметилювання [2].

Під час раннього ембріонального розвитку більшість послідовностей ДНК підвержені деметилюванню, проте існують старіші підродини LINE-елементів, які залишаються метильованими та неактивними, у той час як L1PA та L1HS - молодші підродини залишаються активними. LINE-елементи - це фрагменти ДНК, що здатні самокопіюватися та вставлятися у нові місця геному. Було виявлено, що активні LINE-елементи мають делеції у 5'-нетрансльованих ділянках, через це білок ZNF93 не здатний з ними зв'язуватися і викликати метилювання [7].

У кінці минулого десятиліття під час досліджень Zhou та його колег було виявлено, що PMDs (частково метильовані домени) є в більшості нормальних клітин, у той час як в ракових та старіючих частота метилювання знижується. Вони припустили, що рівень гіпометилювання PMDs залежить від кількості мітотичних поділів клітини. Також було визначено, що ранні екстраембріональні клітини та пухлинні клітини мають схожі риси у метилюванні. Крім того, одночасно зі зменшенням рівня метилювання PMDs, частота метилювання в CpG-насичених доменах, на долинах метилювання DMVs, збільшується [1].

В 2018 році Chuan-Le Xiao, Song Zhu та інші виявили 881,240 сайтів модифікації 6mA в людському геномі. Це модифікація ДНК N6-метиладенін (6mA) є дуже поширеною серед прокаріотів, проте також наявна в людському геномі на ділянках активно транскрибуючих генів. Для метилювання застосовується метилтрансфераза N6AMT1, а для диметилювання ензим ALKBH1. Дослідження показало, що зниження рівня 6mA є однією з причин ініціювання канцерогенезу [8].

1.2. Вікові аспекти процесів метилювання ДНК

Упродовж останнього десятиліття встановлено, що епігенетичні мітки метилювання ДНК у певних геномних ділянках можуть точно відображати хронологічний вік людини. Крім того, так звані епігенетичні "годинники", зокрема модель Horvath, використовуються не лише для оцінки віку, але й для прогнозування біологічного старіння та ризику вікових захворювань [9]. Метилювання ДНК також корелює з онкогенезом, було виявлено зв'язок між віковими епігенетичними змінами та зростанням ризику розвитку злоякісних пухлин [10].

1.2.1. Вікові зміни метилювання ДНК у здорових клітинах.

У нормальних клітинах із віком відбуваються два паралельні епігенетичні процеси: локусспецифічне гіперметилювання та глобальне гіпометилювання. У 2015 році С. Горвант створив багатотканинний епігенетичний годинник, що уможливорює оцінити вік на базі метилювання ДНК в різних типах людських клітин. Він визначив, що в ембріональних і індукованих плюрипотентних стовбурових клітинах вік приблизно нульовий, але чим більше поділів клітини відбулося, тим вік більший. У пухлинних клітинах часто фіксується прискорене епігенетичне старіння — до 36 років понад хронологічний вік [11].

Головними мішенями вікового гіперметилювання є CpG-острови, асоційовані з генами, які регулюються білками комплексу Polycomb (PCGTs), що функціонують як інгібітори експресії генів диференціації стовбурових клітин. Зміна епігенетичного стану цих ділянок може призводити до втрати клітинного контролю та підвищення ризику канцерогенної трансформації клітин [9].

1.2.2. Метилювання ДНК та вікові захворювання.

- Серцево-судинні захворювання

Довголіття - це ніщо інше, як здорове старіння, а дегенеративні та хронічні захворювання є ознаками прискореного старіння і причинами передчасної смерті. Одними з найбільш поширених вікових захворювань є серцево-судинні і вони мають опосередкований зв'язок з метилюванням ДНК. Наприклад, гіперметилювання генів, що контролюють судинний тонус та запальні реакції, сприяє розвитку гіпертензії й атеросклерозу.

Одним з факторів порушення нормального метилювання є куріння, яке може змінювати епігенетичний профіль клітин. Зокрема, зміни в метилюванні ДНК можуть впливати на експресію генів пов'язаних із регуляцією серцево-судинних функцій [12].

- Онкологічні захворювання

З віком зростає ризик епігенетичної інактивації генів-супресорів пухлин. Дослідники ідентифікували ген RYR2, що є потенційним фактором впливу на виникнення раку. RYR2 (рецептор ріанодину 2) - це ген білку, що відповідає за регуляцію вивільнення кальцію в клітинах. Гіперметилування промотору RYR2 знижує його експресію та індукує онкогенез [13].

- Нейродегенеративні захворювання

У патологіях, таких як хвороби Альцгеймера, Паркінсона та синдром Дауна, описано аномалії метилування CpG-островів. Наприклад, білок ANK-1 у нормі виконує провідну функцію: він зв'язує білки мембрани клітини з її цитоскелетом. Ця взаємодія забезпечує структурну підтримку нейронів, зокрема їх аксонів та дендритів. Крім того, ANK-1 необхідний для належного функціонування іонних каналів і бере участь у процесі передачі сигналів між нейронами. Гіперметилування ANK1 порушує архітектуру нейронів, що пов'язано з погіршенням когнітивної функції [12].

- Автофагія

Автофагія — процес деградації пошкоджених органел, який з віком знижується. Це було підтверджено у ході досліду на старих мишах в яких було виявлено гіперметилування промоторних областей генів Atg5 і LC3, через що порушувалося утворення автофагосом [12]. Аналогічно цьому, гіперметилування промотору гену FoxO3a пригнічує автофагію та сприяє віковій ендотеліальній дисфункції [14].

- Синтез білка

У старіючих клітинах спостерігається гіперметилування CpG-островів в промоторних регіонах рибосомної ДНК, що призводить до

пригнічення транскрипції та значного зниження експресії рибосомних РНК (18S, 5.8S, 28S) і уповільнює синтез білків [15].

Також із віком змінюється активність DNMT3a, DNMT3b та TET-ферментів, що призводить до порушення балансу між самовідновленням і диференціацією клітин[16].

1.2.3. Вікові зміни метилювання та гени-супресори пухлин.

Гени-супресори пухлин контролюють ріст і поділ клітин, їх критична функція полягає у запобіганні неконтрольованої проліферації клітин та канцерогенезу. Проте з віком зростає ймовірність епігенетичної інактивації цих генів. Це може призвести до пригнічення певного функціоналу цих генів, зокрема:

- Порушення механізмів репарації ДНК, як наслідок - накопичення мутацій та онкогенез;
- Перешкоджання нормальному перебігу апоптозу, “несправні” клітини виживають та продовжують проліферацію;
- Неконтрольований ріст та трансформація через хаотичну проліферацію.

Виділяють 3 основні гени- супресори пухлин : CDKN2A, PTEN та BRCA1/2.

Одним з головних факторів розвитку меланоми є гіперметилювання гену CDKN2A, що кодує білки p16 (p16INK4a) та p14 (p14ARF), які можуть інгібувати циклін-залежні кінази CDK4 і CDK6, та активувати білок p53. Тобто цей ген відповідає за регуляцію клітинного циклу, а саме перехід клітини з фази G1 у фазу S та репарацію ДНК, або апоптоз. Інактивація цього гену відбувається через мутації, делеції та епігенетичні зміни, більш того це один з найголовніших генів, що підвищує ризик

розвитку спадкової меланоми. Дослідження показують інактивацію p16 у 67,5% випадків меланоми, p14 у 27,4% випадків [17,18] .

Іншим цікавим геном є PTEN, який виконує основну роль у регуляції клітинного росту, проліферації та метаболізму, ця ліпідна фосфатаза регулює PI3K-AKT-mTOR шлях. У нормі PTEN гальмує процес активації PI3K – PIP3, через що пригнічується активація AKT та зупиняється проліферація. Якщо PTEN не функціонує належним чином, то IP3 накопичується, і шлях PI3K-AKT-mTOR стає надмірно активним, що призводить до неконтрольованого росту клітин. У 35% пацієнтів, що хворіють на пізні стадії меланоми, визначають “втрату” гену PTEN у комбінації з мутаціями BRAF [19]. Критичним механізмом інактивації PTEN є гіперметилування його промотору, яке корелює з низьким рівнем виживаності пацієнтів з меланомою [20].

Ген BRCA1 регулює репарацію дволанцюгових розривів ДНК та апоптоз. Мутації цього гену призводять до розвитку раку молочної залози та яєчників, у той час як мутацій у гені BRCA2 мають підвищений ризик розвитку меланоми. Було виявлено, що середній ризик розвитку меланоми для чоловіків та жінок становить 1-2%, тоді як для носіїв мутацій у гені BRCA2 цей ризик становить 3-5% [21,22].

Таким чином, вікові зміни метилування значною мірою впливають на функціонування генів-супресорів пухлин, порушуючи клітинний контроль та сприяючи онкогенезу.

1.3. Особливості розвитку меланоми з урахуванням вікових змін

1.3.1. Клінічні типи меланоми.

Меланома — це злоякісне новоутворення меланоцитів, клітин, які продукують меланін у базальному шарі епідермісу (колір шкіри, волосся та

райдужки ока). Ці клітини походять із нервового гребеня, тобто мають спільне походження з нейронами та гліальними клітинами, тому також здатні мігрувати в організмі під час його розвитку. Ця здатність призводить до дуже швидкого метастазування при їх мутації в ракові клітини, до того ж меланоцити експресують сигнальні молекули та фактори росту, завдяки яким клітини адаптуються до нового середовища. Меланому визначають лише у 1% людей, що хворіють на рак шкіри, проте вона є найагресивнішою формою цього захворювання і близько 80% смертей цього типу раку відбувається через неї [23].

Залежно від клінічного перебігу, гістологічної структури та локалізації, виділяють декілька основних типів меланом:

- Поверхнево-поширена меланома (Superficial Spreading Melanoma, SSM)

Найбільш поширена меланома від 70% до 80% пацієнтів мають цей тип раку. Це поверхневий тип раку шкіри, виявляється у вигляді плоскої коричневої чи чорної плями з нерівними краями. SSM повільно розростається горизонтально і потім проникає глибше в шкіру. У чоловіків найчастіше зустрічається на спині та руках, а в жінок - на ногах.

- Акральна лентигінозна меланома

Цей тип меланоми зустрічається від 1% до 3% пацієнтів, проявляється на долонях, підшвах та під нігтьовими пластинами. Проте, це найпоширеніший тип раку шкіри у людей з темною шкірою.

- Слизова меланома

Рідкісний тип раку, що важко діагностувати через його локацію на слизових оболонках, таких як порожнина рота, носа, аноректальна область та піхва.

- Меланома на хронічно пошкодженій сонцем шкірі (Lentigo maligna melanoma)

Типова для людей похилого віку, особливо на обличчі, шиї та руках. Розвивається з лентіго (пігментованих плям) та характеризується повільним ростом.

- Увеальна меланома

Виникає в структурах ока, таких як райдужка, війкове тіло та судинна оболонка, цей тип захворювання має дуже агресивний перебіг і більше половини пацієнтів помирають від активного метастазування [24,25].

1.3.2. Епідеміологія та вікова статистика.

Згідно з останніми даними SEER, меланома є п'ятим найпоширенішим діагнозом раку в США, з 100 640 оцінених нових випадків у 2024 році, що становить 5% від усіх діагнозів раку. Меланома особливо поширена серед білих чоловіків, з захворюваністю (на 100 000) 38,1 серед білих чоловіків та 25,6 серед білих жінок. У той час як захворюваність серед чоловіків та жінок Non-Hispanic Black становила 1,0 та 0,9, та 4,5 для обох статей серед латиноамериканців. Середній вік діагностики 66 років, причому більшість діагнозів ставляться у віці від 65 до 74 років (Рис. 1) [23,26].

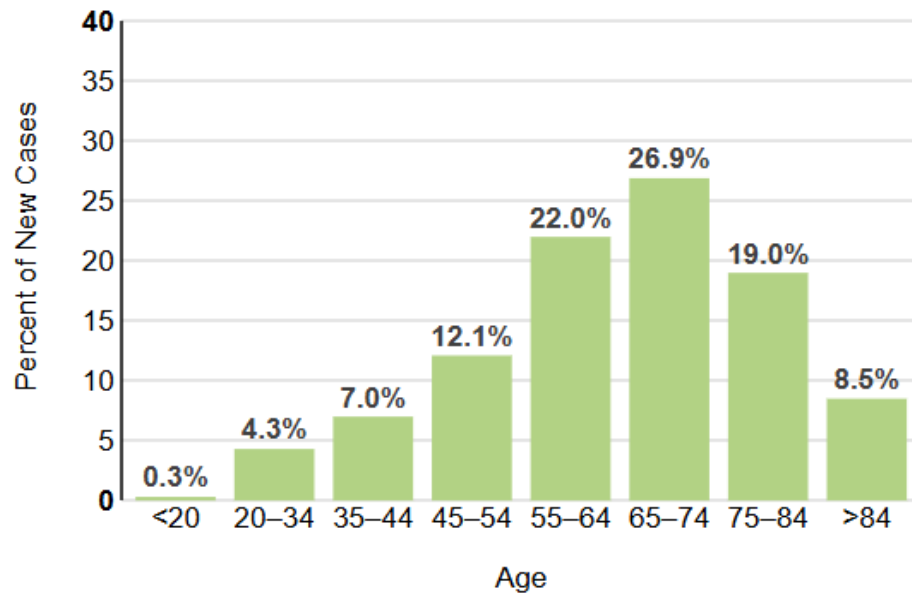
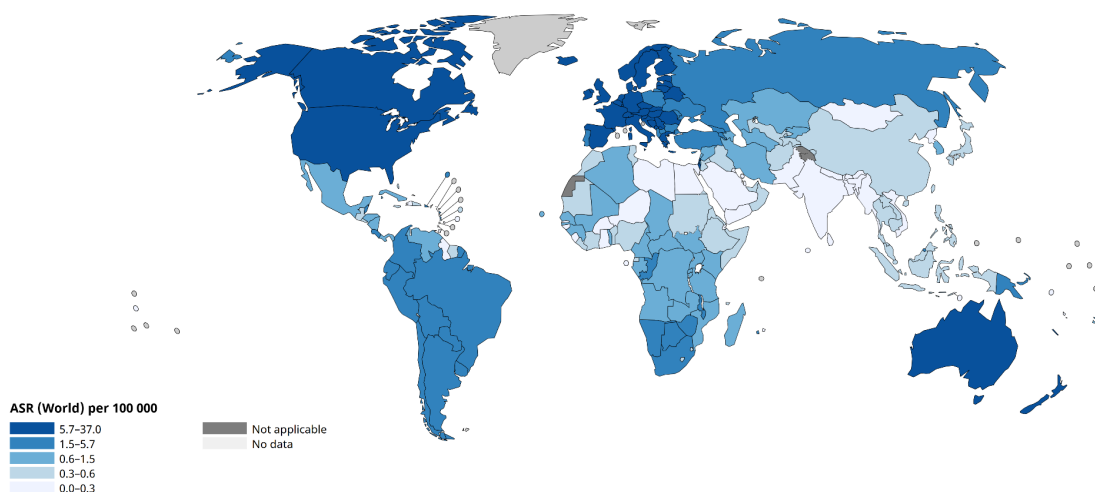


Рис. 1.1. Стовпчаста Рис. показує відсоток ідентифікації меланоми шкіри за віковою групою у період 2017 - 2021 для всіх рас та статей в США. Дані отримані з SEER [23].

Кількість пацієнтів, що хворіють на меланому збільшується кожного року, особливо в розвинених країнах. Найгірша ситуація, на 2022 рік, в Австралії (37.0) ASR, де на кожних 100 000 австралійців припадає 37 нових випадків меланоми (Рис. 2). Подібна ситуація відбувається в Європі, а саме Данія (31.1), Норвегія (30.6), Швеція (27.4) та Нідерланди (25.9), США займає 11 місце в цьому рейтингу з показником (18.1), а Україна 42 - (4.9). Найменш вразливими країнами вважаються Гана, В'єтнам, Монголія та Непал з показниками менше (0.2) [27].

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Melanoma of skin



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
Data version: Globocan 2022 (version 1.1) - 08.02.2024
© All Rights Reserved 2025

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Рис. 1.2. На мапі зображено кількість нових випадків захворювання на меланому, що виникли у різних країнах світу протягом 2022 року. Дані отримані з Globocan 2020 [27].

Згідно з глобальною статистикою раку за регіонами світу за 2022 рік було зафіксовано майже 20 мільйонів нових випадків раку та 9,7 мільйонів смертей. Зокрема 58 667 летальних випадків через захворювання на меланому шкіри, Нова Зеландія має найвищий рівень смертності, 3.9 на 100 000 осіб, що може бути пов'язано з інтенсивністю впливу ультрафіолетового випромінювання (Рис. 2). У той час як Західна Африка та Південно-Центральна Азія мають порівняно менший рівень смертності. Україна займає 21 перше місце серед 162 країн, з показником 1.6 на кожні 100 000 осіб [27,28]. Меланома становить понад 80% смертей від раку шкіри, і найбільша смертність від меланоми спостерігається серед чоловічої статі [26].

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Mortality, Both sexes, in 2022
Melanoma of skin

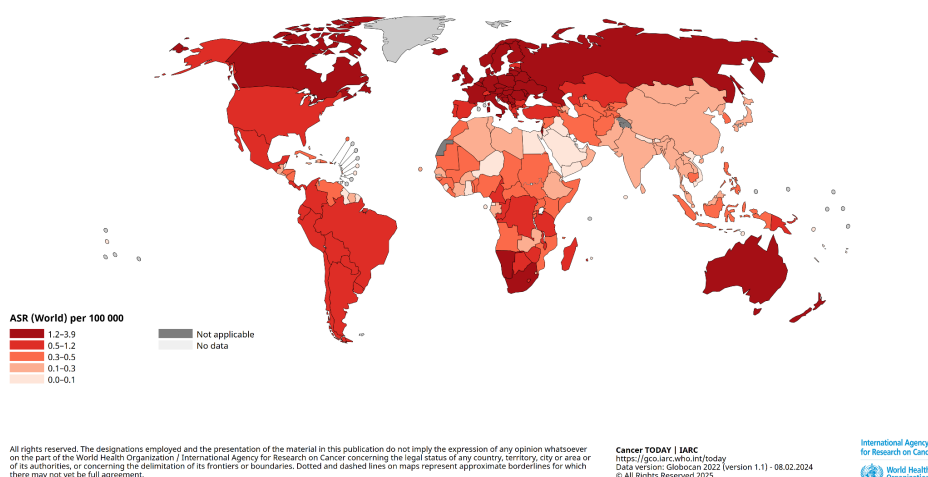


Рис. 1.3. Мапа показує кількість летальних випадків захворювання на меланому, що виникли у різних країнах світу протягом 2022 року. Дані отримані з Globocan 2020 [27].

Отже, меланома є серйозною глобальною проблемою охорони здоров'я з чітко вираженими віковими та географічними особливостями. Наявні дані підкреслюють вагому роль як етнічних, вікових так і екологічних чинників, зокрема рівня ультрафіолетового випромінювання, у формуванні груп підвищеного ризику.

1.3.3. Вікові молекулярно-біологічні зміни при меланомі.

Основним фактором розвитку меланоми шкіри є УФ-випромінювання, яке поділяється на 2 типи: УФ-А (320–400 нм) та УФ-В (280–320 нм). І хоча останнє є у 1000 разів більш генотоксичним на фотон, тобто спроможним викликати пошкодження ДНК, УФ-А має більший загальний вплив, бо зустрічається найчастіше в навколишньому середовищі, зокрема, сонце, солярії та скло. Вплив надмірного ультрафіолету викликає окислювальні пошкодження ДНК (тимідинові димери, 6-4 фотопродукти), які досить важко відновляються і це може призвести до мутацій. Наприклад, молоді пацієнти з великою кількістю

невусів мають мутацію BRAF (V600E), у старших людей частіше зустрічається мутації в NRAS [26].

Пігментація шкіри також має вплив на розвиток меланому, таким чином у людей, що мають еумеланін (темний пігмент), ризик виникнення меланому значно знижується. А люди з феомеланіном (світлий пігмент) більш уражені захворюванням раку шкіри, бо мають менш ефективний захист від УФ-променів.

Невуси (родимки) можуть бути маркерами ризику виникнення меланому, було проведено дослідження, що люди з понад 100 невусами мають у 7 разів вищий ризик розвитку меланому, ніж ті, хто має менше 15 родимок. Та чим довше родимка знаходиться на тілі людини, тим вища вірогідність її перетворення на злоякісну [29].

Епігенетичні механізми, такі як зміни у синтезі мікроРНК (miRNA), некодуючих РНК (ncRNA), модифікації гістонів та метилюванні ДНК, відіграють вирішальну роль у розвитку та прогресуванні меланому. Вони впливають на ранній стадії канцерогенезу, а також можуть сприяти резистентності до лікування та ухиленню від імунної відповіді пухлини [30].

Було визначено, що зміни в цих генах є факторами розвитку меланому: BRAF, NRAS, MITF, KIT, TP53, CDKN2A, PTEN, NF1, RAC1, IDH1, ARID2 [31].

1.3.3.1. Мутації BRAF (V600E).

Дана генетична аберація є однією з найпоширеніших у пацієнтів з меланою, спостерігаючись приблизно у 40–60% випадків, з тенденцією до більш частого виявлення у молодих пацієнтів. Ця мутація активує

сигнальний шлях MAPK, що призводить до неконтрольованого росту клітин і викликає агресивний перебіг хвороби.

BRAF – це ген, що кодує серин/треонінову кіназу, яка є частиною MAPK-сигнального каскаду (RAS/RAF/MEK/ERK). Для мутації BRAF характерна зміна валіну (V) на глутамінову кислоту (E) у положенні 600, через що відбувається постійна активація білка BRAF, і як наслідок клітина, незалежно від факторів росту та мікрооточення, неконтрольовано росте и оногенує.

Шлях MAPK починається з того, що рецептор RTK активується після зв'язування фактору росту з рецептором EGFR, призводячи до активації RAS, GTP-залежного білка (Рис. 1.4.). У нормі BRAF активується тільки після отримання сигналу від RAS, але при мутації V600E BRAF залишається постійно активним, що викликає незалежну активацію MEK та ERK. MEK фосфорилує ERK, після чого ERK мігрує в ядро, де активує транскрипційні фактори, такі як MYC, FOS та JUN, і таким чином активується проліферація [32].

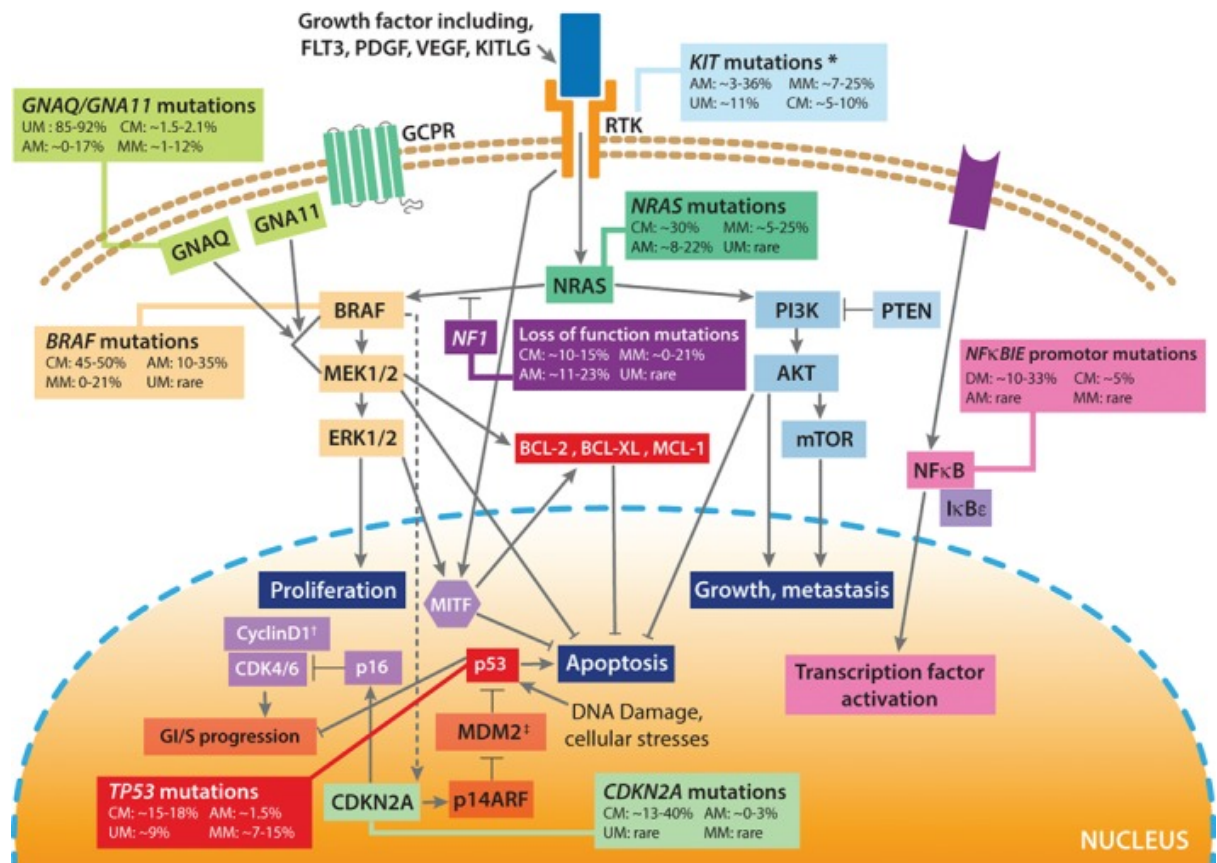


Рис. 1.4. Схема, що показує мутації, пов'язані зі шляхом RAS/RAF/MEK/ERK, які спостерігаються при меланомі [32].

1.3.3.2. Мутації NRAS.

Вони частіше виявляються у пацієнтів старшого віку, з частотою близько 15–20%. NRAS (neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) – це один із членів RAS-сімейства малих GTP-аз, що відіграє центральну роль у сигнальних шляхах, що регулюють ріст, проліферацію та виживання клітин. NRAS працює як перемикач, у неактивному стані він зв'язаний з GDP, а у активному - з GTP і передає сигнал далі по MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) та PI3K-AKT-mTOR шляхах (Рис. 1.4.).

Найпоширенішою мутацією є Q61K/Q61R/Q61L (екзон 3, кодон 61), що призводить до заміни глутаміну на лейцин у позиції 61, це робить NRAS постійно активним, і стимулює неконтрольований ріст пухлинних клітин. Ця мутація є більш небезпечною, порівняно з BRAF (V600E), бо контролює 2 основних онкогенних шляхи і є менш чутливою до терапії.

Якщо MAPK відповідає за проліферацію та міграцію, то PI3K-AKT-mTOR блокує апоптоз та ініціює метастазування (Рис. 1.5.) [33,34].

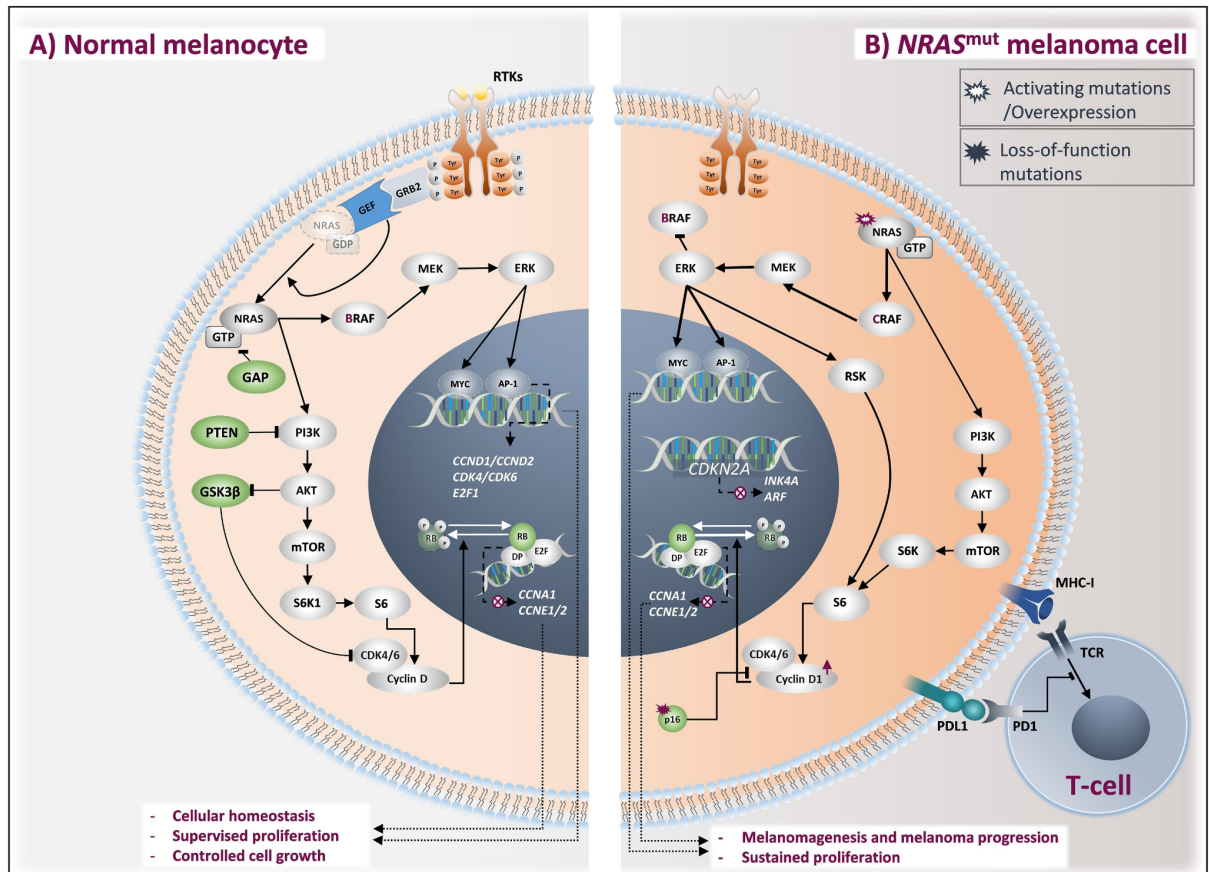


Рис. 1.5. Порівняння двох сигнальних шляхів NRASWT та NRAS мутантний [34].

(A) Шлях NRAS за нормальних фізіологічних умов. Після ліганд-опосередкованої димеризації та автофосфорилування RTK, NRAS активується приєднанням GRB2 та GEF. Активний NRAS ініціює активацію шляхів MAPK та PI3K. Каскад MAPK індукує AP-1-опосередковану експресію циклінів D-типу, підтримуючи прогресування клітинного циклу. PI3K призводить до залучення та активації кінази AKT, яка регулює mTOR та його нижчестоящий ефектор S6K, що додатково сприяє прогресуванню клітинного циклу через посилену трансляцію цикліну D1. Каталітична активація циклонів D-типу та утворення комплексу з CDK4/6 має фундаментальну роль у ранньому G1-комітуванні клітинного циклу.

(B) NRAS активація онкогенної передачі сигналу може спричинити виникнення та стійке прогресування меланому через сигналізацію MAPK, надмірну експресію цикліну D1 та інактивацію p16INK4A. Крім того, клітини меланому, що експресують PDL1, призводять до уникнення імунної відповіді, зменшуючи активність ефекторних Т-клітин через взаємодію PD1L та PD1 [34].

1.3.3.3. Мутації NF1.

Мутації в гені NF1 пов'язані з нейрофіброматозом 1 типу, який підвищує ризик розвитку меланому. Ця мутація виникає у людей що знаходяться під постійним впливом сонця та у літніх людей. NF1 кодує білок нейрофібрин, який інгібує RAS – опорний білок у MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) сигнальному шляху. Його втрата чи мутація призводить до неконтрольованого поділу клітин. Більше того, було доведено, що NF1 має вагоме значення для формування ламелоподій (спеціальні мембранні виступи для руху клітини) та контролювання полімеризації актину, що також є визначальним для міграції клітини. Порушення його нормального функціонування може посилювати здатність меланомних клітин до інвазії та метастазування [35].

1.3.3.4. Мутації Triple wild-type.

Характеризується відсутністю мутацій у генах BRAF, NRAS та NF1. Цей підтип меланому частіше зустрічається у літніх пацієнтів і може мати особливий клінічний перебіг. Цей тип меланому зустрічається у 10–15% випадків, найчастіше у акральній лентигінозній меланомі (ALM), слизовій меланомі (MM) та увеальній меланомі.

Triple wild-type найбільш поширений серед чоловіків і зосереджений у більшості випадків на ногах. Узагальнюючи, TWT - це гетерогенний підтип меланому, якому характерно мати рідкісні мутації (KIT, GNAQ, MDM2 або NTRK) або порушення в сигнальних шляхах. Для лікування

цього виду є обов'язковим генетичне типування пухлини для застосування таргетної імунотерапії [36,37].

Таким чином, при захворюванні на меланому визначаються суттєві вікові відмінності клінічного перебігу, гістології, молекулярних мутацій та епігенетичних змін. Розуміння цих особливостей дає змогу ефективніше прогнозувати перебіг хвороби, персоналізувати лікування та ідентифікувати нові вікозалежні біомаркери.

1.4. Онтогенетичні характеристики метилювання ДНК у контексті онкогенезу

Динамічний процес метилювання ДНК виступає одним із провідних епігенетичних механізмів, що забезпечують точну регуляцію експресії генів на різних стадіях онтогенезу. Цей процес відіграє вирішальну роль у забезпеченні нормального розвитку, клітинної диференціації та підтримці гомеостазу. Порушення метилювання ДНК можуть значно впливати на розвиток патологічних станів через вплив на баланс між проліферацією, апоптозом та генетичною стабільністю клітин.

У ході розвитку меланоми відбувається складний процес перебудови епігенетичної регуляторної системи, зокрема, загальне зниження рівня метилювання в багатьох ділянках геному, але з одночасним підвищенням метилювання в промоторних зонах генів-супресорів пухлин. Це сприяє збереженню злоякісного фенотипу в профілі ДНК [38].

Рівень метилювання ДНК змінюється залежно від етапу онтогенезу. Під час ранніх стадій ембріогенезу відбувається глобальне деметилювання, що забезпечує пластичність клітин. У процесі диференціації поступово формуються тканинно-специфічні епігенетичні мітки, завдяки яким у дорослому організмі підтримується динамічний баланс між гіпо- та гіперметилюванням, необхідний для нормального функціонування клітин.

З віком, а також під дією мутацій чи зовнішніх чинників, регуляторна рівновага між гіпо- та гіперметилуванням може порушуватися, і це сприяє розвитку злоякісних пухлин. Зокрема, гіпометилування ДНК активує онкогени та підвищує генетичну нестабільність, що сприяє накопиченню мутацій. Водночас гіперметилування промоторів генів-супресорів пухлин, таких як CDKN2A, PTEN, BRCA1, блокує їх експресію, позбавляючи клітину природних механізмів контролю росту і поділу.

Окрім гіпометилування та гіперметилування, вирішальним фактором є деметилування ДНК, маркером якого являється 5-гідроксиметилцитозин (5-hmC). Дослідження показали, що рівень 5-hmC значно знижується у клітинах меланоми порівняно з нормальними меланоцитами або доброякісними невусами, причому ступінь втрати цього маркера залежить від стадії прогресії пухлини [39].

У 2021 році Giunta, Arrichiello та колеги узагальнили дані про епігенетичну регуляцію меланоми, підтвердивши провідну роль метилування ДНК, модифікацій гістонів та некодуючих РНК (ncRNA) у формуванні злоякісного фенотипу, розвитку резистентності до терапії, імуноухилення та прогресії захворювання. Зокрема, метилування CpG-острівців у промоторних зонах генів-супресорів пухлин сприяє їх пригніченню на ранніх стадіях онкогенезу. У прогресуючих захворюваннях долучаються інші механізми епігенетичного регулювання, включаючи перезапуск епігенетичної програми клітин-попередників нейрального гребеня, до яких, належить меланоцитарна лінія. Таким чином, епігенетичні зміни є перспективними маркерами діагностики та прогнозу протікання меланоми [40].

У меланомі також спостерігається гіперметилування генів мікроРНК, таких як miR-34a, miR-203 та miR-205, що призводить до їхньої супресії. Ці мікроРНК виконують роль пухлинних супресорів, регулюючи процеси проліферації, апоптозу та міграції клітин [41]. У нормі в

меланоцитах та доброякісних невусах протипухлинні мікроРНК експресуються, а пухлиносприятливі заглушуються. При меланомі ж експресія протипухлинних мікроРНК пригнічується за рахунок гіперметилування CpG-островів у промоторах їх генів (Рис. 1.6.).

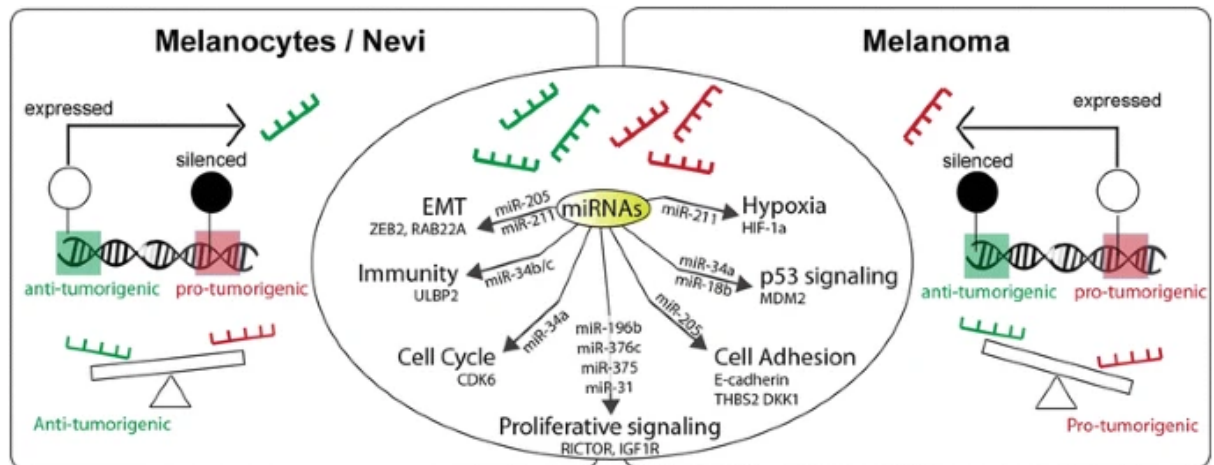


Рис. 1.6. Епігенетична регуляція експресії мікроРНК у меланоцитах/невусах та меланомі [41].

1.4.1. Метилування ДНК при розвитку меланоми.

Були проведені дослідження в ході яких визначили, що після тривалого впливу УФВ частина CpG-сайтів ДНК втрачає метилування, а частина – приєднує метильну групу. До того ж, ці зміни є стабільними і можуть успадковуватися під час клітинного поділу.

Існує залежність між локалізацією гуперметилування та гіпометилування, а саме міжгенні регіони та промоторні області генів, відповідно. Однак, CpG-острівці загалом менше піддаються впливу УФВ, проте ті що локалізовані в гетерохроматинових регіонах є більш вразливими. Їх легко можна визначити завдяки репресивній мітці гетерохроматину - H3K9me3, через яку відбувається довготривала інактивація цього гену [42]. Згідно з когортним аналізом 462 зразків меланоми, було визначено, що пацієнти з вираженими змінами метилування, викликаними ультрафіолетовим випромінюванням, мають

кращу виживаність порівняно з тими хто мають менш виражені зміни метилювання [43].

Оцінка епігенетичних біомаркерів має великий потенціал для скринінгу, діагностики, визначення типів пухлин, прогнозування відповіді на терапію та виживаності пацієнтів. Секвенування метильованої cfDNA показало її високу цінність для ранньої діагностики меланоми та кореляцію виду метилювання з ефективністю лікування та загальним впливом на меланому (Таблиця Г.1) [44].

У 2019 році група вчених Guo, Zhu та інші визначили прогностичні маркери метилювання ДНК у когорті пацієнтів із меланомою. За допомогою уніваріантного регресійного аналізу Кокса було виявлено 4454 CpG-сайти, асоційовані з виживаністю пацієнтів із меланомою, згодом була підібрана оптимальна модель, що включала 4 CpG-сайти: cg06778853, cg24670442, cg18456782, cg26263675. На основі їх β -значень було побудовано формулу ризику для прогнозування виживаності, були отримані такі результати [45]:

- **cg24670442** та **cg18456782** мали вищий рівень метилювання, який пов'язаний із гіршою виживаністю.
- **cg06778853** та **cg26263675** також мали вищий рівень метилювання, але який асоціювався з кращою виживаністю пацієнтів.

Ген *KLHL21* відповідає сайту **cg06778853**, ген *GBP5* - сайту **cg24670442**, ген *OCA2* - сайту **cg18456782**, а ген *RAB37* - сайту **cg26263675**. Вчені виявили, що ця прогностична модель є точнішою, ніж клінічні фактори, зокрема вік та стадія захворювання (Рис. 1.7.).

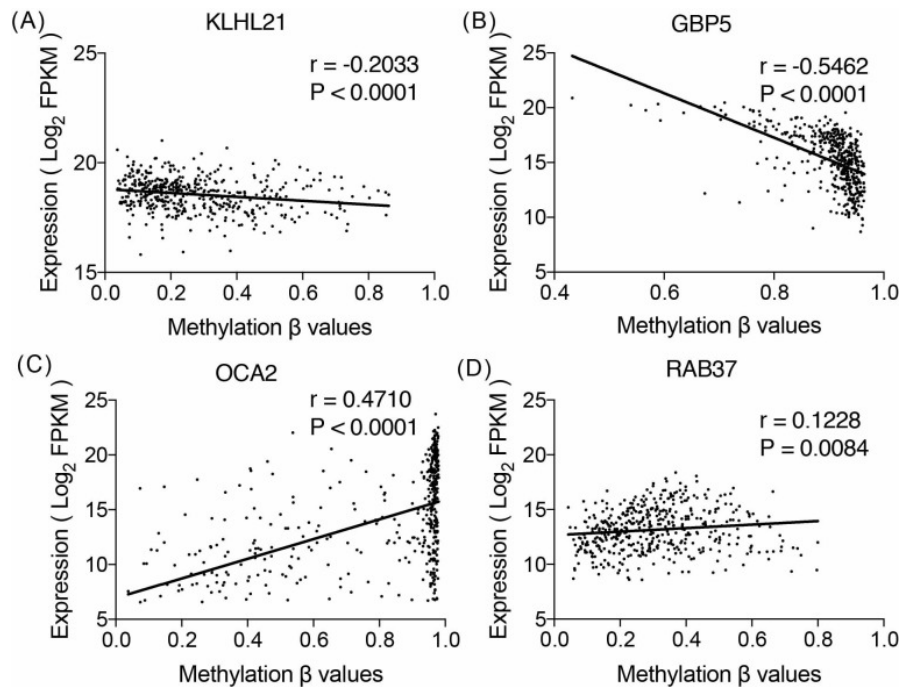


Рис. 1.7. На діаграмі зображена кореляція між рівнем метилювання ДНК (β -value) і рівнем експресії відповідних генів для чотирьох CpG-сайтів [45].

Інші дослідження показали, що метилювання ДНК, а в регіонах CpG-сайтів генів PON3, MEOX2, OLIG3, а також білкова експресія OVOL1, AKT3, TFAP2B, також демонструють високий потенціал як прогностичні біомаркери при меланомі шкіри [46].

Gudrun Ratzinger та його колеги також вивчали стан метилювання промоторів генів, які залучені в канцерогенез меланоми та виявили ген TNFRSF10D, метилювання промотора якого є прогностичним маркером загальної виживаності та виживаності без рецидиву у пацієнтів з меланомою [47].

Більш того, в 2022 році вченим вдалося ідентифікувати гени, метилювання яких відповідає за транскрипційно визначені фенотипи меланоми: інвазивний або проліферативний. Перший тип пов'язаний з геном INPP4B, а другий - ADCY3 [48].

У 2023 році було запропоновано новий підхід комбінованої оцінки CpG-метилування та експресії генів для побудови прогностичної моделі. Такий підхід дозволив виявити гени, що впливають як на виживаність, так і на відповідь на терапію у пацієнтів із меланою. Для підтвердження прогностичної цінності трьох CpG-сайтів у незалежних вибірках було проведено Kaplan–Meier аналіз та ROC-аналіз на двох незалежних наборах даних, і підтверджено, що модель має високу прогностичну точність навіть при обмеженій кількості даних [49].

Зміни у рівні метилування ДНК, особливо в ділянках, багатих на CpG-сайти, можуть мати значення як прогностичні біомаркери при меланомі. У деяких випадках виявлені епігенетичні зміни корелюють не лише з виживаністю пацієнтів, але й з ефективністю терапії. Це відкриває можливості для більш персоналізованого підходу до лікування, де характеристики метилування можуть враховуватись при виборі стратегії.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Об'єкт і предмет дослідження

Об'єктом дослідження є метилювання CpG-сайтів у промоторних ділянках генів-супресорів пухлин та онкогенів у пацієнтів з меланомою шкіри.

Предметом дослідження є зв'язок між рівнем метилювання ДНК та виживаністю пацієнтів із урахуванням вікових та клініко-генетичних характеристик.

2.2. Дані та джерела

У дослідженні використано відкриті дані консорціуму The Cancer Genome Atlas (TCGA) для меланоми шкіри (TCGA-SKCM), які включають:

- метиломні дані (HumanMethylation450k);
- клінічні та демографічні характеристики пацієнтів (вік, стать, статус виживаності, тривалість спостереження) завантажені у форматі JSON з вебсайту TCGA;
- мутаційний статус ключових генів (BRAF, NRAS, NF1 та Triple Wild Type) взято з MAF-файлів (Mutation Annotation Format) для проєкту TCGA-SKCM, оброблені за допомогою пакету TCGAbiolinks;
- анотаційна бібліотека в RStudio для визначення локалізації CpG-сайтів відносно генів (функціональна область промоторів: TSS1500, TSS200).

2.3. Інструменти аналізу даних

2.3.1. Інтеграція та обробка даних:

RStudio:

- Завантаження метиломних даних β -value з платформи Illumina HumanMethylation450K за допомогою пакету TCGAAbiolinks;
- Анотація CpG-сайтів із використанням IlluminaHumanMethylation450kanno.ilmn12.hg19 та minfi;
- Фільтрація CpG-сайтів у промоторних ділянках генів-супресорів та онкогенів;
- Об'єднання масивів метилювання з клінічними даними;
- Експорт фінального датасету у форматі .csv для подальшого аналізу в Python.

SQL (DBeaver):

- Первинна агрегація даних, злиття таблиць клінічної інформації та метиломних профілів;
- Первинна аналітика даних та перевірка відсутніх значень

Python:

- pandas, numpy - застосовувалися для виконання операцій з обробки та маніпуляції даними, включаючи транспонування таблиць, їх об'єднання та перевірки;
- Lifelines - використовувалися для побудови функцій виживаності за методом Каплана–Мейєра, регресії пропорційних ризиків Кокса (CoxPHFitter), а також для оцінки достовірності моделі за допомогою log-rank test;

- scikit-learn — застосовувався для розробки класифікаційних моделей виживаності (RandomForestClassifier);
- shap (SHapley Additive exPlanations) — використовувався для інтерпретації важливості окремих CpG-сайтів у формуванні індивідуального ризику;
- Matplotlib, Seaborn - бібліотеки, які використовувалася для візуалізації даних;
- Попередня обробка змінних: нормалізація, кодування, фільтрація за наявністю значень.

2.3.2. Методи статистичного аналізу:

- Kaplan–Meier — використовувався для оцінки функції виживаності для стратифікованих груп пацієнтів;
- Log-rank test — застосовувався для порівняння виживаності між групами;
- Регресія Кокса (Cox proportional hazards model) — використовувалася для побудови моделей ризику смерті з урахуванням коваріат;
- Кластеризація (K-means) — застосовувалася для створення ієрархічної кластеризації пацієнтів на основі рівнів метилювання для виявлення підгруп із різним прогнозом;
- SHAP-аналіз (SHapley Additive Explanations) — використовувався для індивідуального рівня аналізу. Зокрема, для кожного пацієнта модель генерувала унікальний профіль із зазначенням того, які CpG-сайти зробили найбільший внесок у прогноз. Таким чином, стало можливим виділити підгрупу пацієнтів з однаковим клінічним статусом, але різним епігенетичним фоном;
- scikit-learn — застосовувалася для побудови класифікаційних моделей (Random Forest) та для розрахунку показників їхньої точності (accuracy, AUC, C-index).

2.4. Прогностичне моделювання

Для побудови та оцінки прогностичних моделей виживаності застосовано:

- Сох-регресію через функцію `CoxPHFitter()` з бібліотеки `lifelines`;
- Лог-ранговий тест для порівняння груп із різним рівнем метилювання;
- Оцінювання точності моделей за допомогою C-index та ROC-AUC (площа під кривою робочої характеристики приймача (ROC AUC) вимірює здатність моделі розрізняти класи.);
- SHAP-аналіз для визначення важливості предикторів у моделях класифікації.

2.5. Візуалізація результатів

Для графічного представлення результатів застосовано:

- Python (`matplotlib`, `seaborn`, `shap`) — для побудови дендрограм, розподілів β -values, `heatmap` та графіків залежностей SHAP, значущості ознак, кривих виживаності;
- Tableau — для інтерактивного дашборду: `heatmaps`, `survival curves`, кореляційних діаграм та фільтрації за клінічними ознаками.

2.6. Етичні аспекти

Усі дані були отримані з відкритих ресурсів TCGA та не містили персоніфікованої інформації. Аналіз проводився відповідно до міжнародних етичних принципів обробки біомедичних даних FAIR та GDPR [50,51].

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Підготовка даних

3.1.1. Збір даних

Рівень метилювання кожного CpG-сайту було представлено у вигляді β -value, що коливається від 0 (повністю неметилюваний) до 1 (повністю метилюваний). Ці дані були отримані за допомогою програмного середовища R-Studio. У результаті було сформовано матрицю, де кожному пацієнту відповідав вектор значень β -value для всіх досліджуваних CpG-сайтів. β -value - основна одиниця вимірювання рівня метилювання для кожного CpG-сайту.

Для визначення локалізації CpG-сайтів відносно генів використовувалась спеціалізована анотаційна бібліотека в RStudio. Далі було застосовано фільтр для виділення CpG-сайтів, пов'язаних із промоторними ділянками (TSS200 та TSS1500) низки цільових генів, що мають відому роль у розвитку меланоми та інших видів раку. До цього переліку увійшли: CDKN2A, PTEN, TP53, NF1, BRAF, NRAS, KIT, MITF, CCND1, CDK4, PIK3CA, AKT3, SKI, AURKB, BCL7A, AGTR1. У результаті було створено нову таблицю, яка містила лише β -values CpG-сайтів, розташованих у промоторах зазначених генів.

Було також експортовано та первинно оброблено дані про соматичні мутації (MAF-файли) для проєкту TCGA-SKCM з використанням пакету TCGAbiolinks для усіх пацієнтів. Далі у Python було проведено фільтрацію за цільовими генами драйверами мутації: BRAF, NRAS, NF1 та WT (дикий тип, якому характерна відсутність мутацій у BRAF, NRAS, NF1). І створену таблицю з ідентифікатором пацієнта та відповідним йому мутаційним статусом, останній було оброблено за допомогою one-hot encoding для подальшого використання алгоритмів машинного навчання.

Паралельно з обробкою даних метилування, з офіційного вебсайту TCGA для проекту TCGA-SKCM було завантажено клінічні дані пацієнтів у форматі JSON. Для подальшого аналізу ці дані оброблялись мовою Python: JSON-конвертація у CSV, виділення потрібних клінічних змінних (ідентифікатор пацієнта `submitter_id`, час до смерті, час до останнього спостереження, вік, стать, раса, стадія захворювання та місце первинного виявлення метастаз) за допомогою DBeaver. Пацієнти з відсутнім значенням стадії захворювання (`ajcc_pathologic_stage`) були включені як окрема категорія `unknown` (Невідомо). Категоріальні змінні, такі як стать і раса, а також показник виживаності, були перетворені у числовий формат для статистичного аналізу. Місце первинного виявлення метастаз було оброблено за допомогою `one-hot encoding` для того щоб уможливити застосування алгоритмів машинного навчання. Крім того для стадії захворювання було створено бібліотеку порядкових змін для збереження логіки порядку:

```
stage_order = {
    'Стадія 0': 0,
    'Стадія 1': 1, 'Stage IA': 1, 'Stage IB': 1,
    'Стадія II': 2, 'Stage IIA': 2, 'Stage IIB': 2, 'Stage IIC': 2,
    'Стадія III': 3, 'Stage IIIA': 3, 'Stage IIIB': 3, 'Stage IIIC': 3,
    'Стадія': 4,
    'unknown': -1 }
```

До кінцевої таблиці клінічних даних увійшли ідентифікатор пацієнта, стать, вік, локалізація пухлини, паталогічна стадія, тип мутації та виживаність (Таблиця В.1).

3.1.2. Попередня обробка

У середовищі RStudio проведено попередню обробку β -value матриці для підвищення якості даних перед подальшими кроками. Перевірено наявність пропущених значень; видалено дублікати зразків, а також ті CpG-сайти (рядки), де кількість відсутніх даних перевищувала 50%. Це дозволило виключити з аналізу ненадійні дані.

Для заповнення пропущених значень у решті матриці застосовано метод імпутації K-найближчих сусідів (KNN). Якщо для певного пацієнта відсутні дані по окремих CpG-сайтах, програма шукає k інших пацієнтів, у яких профіль метилювання максимально схожий, і використовує середнє чи мажоритарне значення серед цих сусідів, щоб оцінити пропущене. На відміну від простого заповнення середнім чи медіанним значенням по колонці, KNN враховує багатовимірні зв'язки між зразками, що дозволяє зберегти індивідуальні варіації. Множинна імпутація занадто складна, оскільки дата фрейм має великий розмір.

Для усунення потенційних систематичних помилок, пов'язаних із технічними варіаціями (пакетні ефекти), застосовано алгоритм ComBat. Пакетні ефекти можуть виникати у великих мультицентрових дослідженнях, таких як TCGA, через різні лабораторні протоколи, обладнання чи реагенти. ComBat будує лінійну модель для кожної ознаки (CpG-сайту), враховуючи біологічні коваріати (вік, стать) та ідентифіковані пакетні ефекти (лабораторія). Це дозволяє мінімізувати вплив технічних факторів на дані, підвищуючи надійність подальшого аналізу.

Для інтеграції даних метилювання з клінічною інформацією використано Python. Об'єднання таблиць β -value, типу мутації та клінічних характеристик пацієнтів здійснювалось за унікальним ідентифікатором `submitter_id`. Після об'єднання інтегрований набір даних було переглянуто й попередньо проаналізовано в DBeaver.

3.2. Вибірковий аналіз

Одним із основних етапів було визначення розподілу β -values для CpG-сайтів, які потенційно можуть слугувати біомаркерами прогнозу виживаності пацієнтів з меланомою. Розподіл β -values дозволяє виявити аномалії в метилюванні, що можуть бути пов'язані з пухлинними процесами.

Широкий розподіл β -значень для CpG-сайтів вказує на високу варіабельність рівня метилювання, яка часто асоціюється з онкогенними змінами [52,53]. Для ідентифікації найбільш варіабельних сайтів використано стандартне відхилення як міру розсіювання (Рис. 3.8.A). CpG-сайти з найвищими значеннями були пов'язані з наступними генами:

- **BRAF:** cg11023901, cg21043558
- **CDK4:** cg03829839
- **AURKB:** cg17365525, cg26183021

Узагальнюючи, CpG-сайти з високою варіабельністю відображають ті ділянки, де ступінь метилювання значно відрізняється між пацієнтами. При меланомі гени-супресори пухлин, такі як CDKN2A, TP53, PTEN, часто стають гіперметилюваними, що веде до їхнього вимкнення. А онкогени (наприклад, BRAF, NRAS) можуть мати інші, протилежні, патерни. Тому CpG-сайти з високою варіабельністю можуть вказувати на критичні точки регуляції, які прямо пов'язані з прогресією пухлини, і як наслідок — з прогнозом виживаності [54]. Вибір таких сайтів для аналізу підсилює біологічну релевантність моделі.

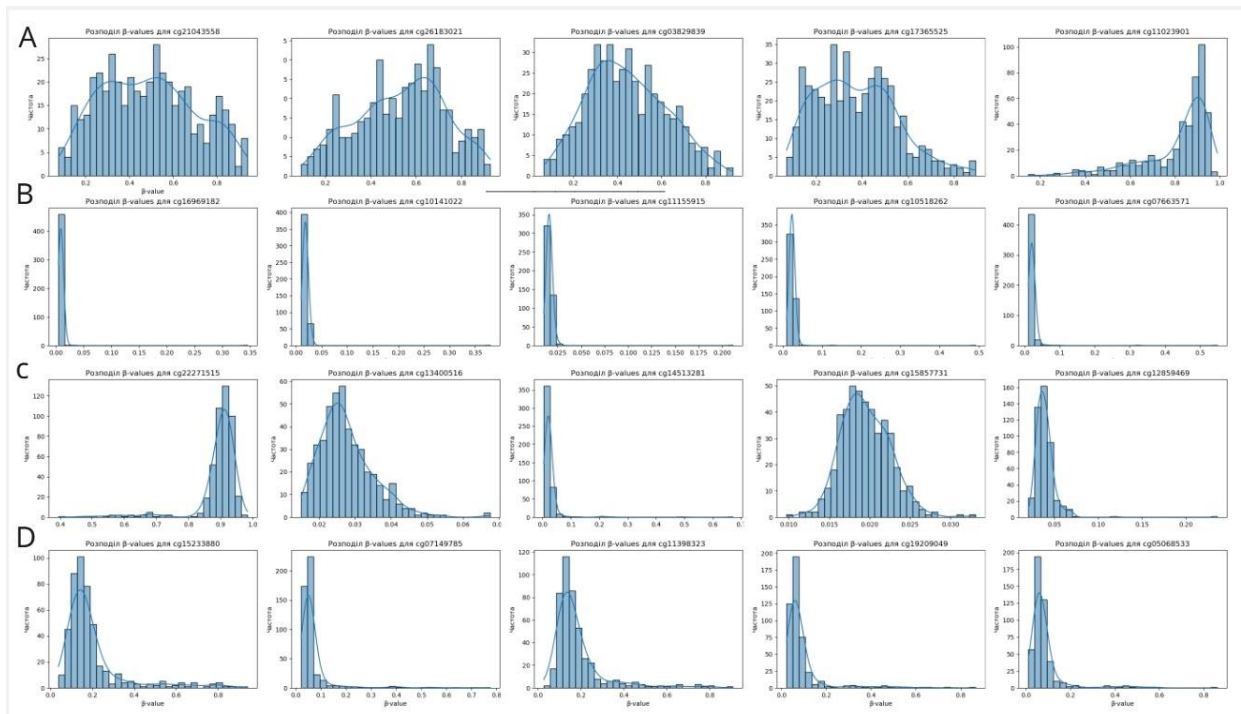


Рис. 3.8. Топ 5 β -values розподілів CpG-сайтів за кожною метрикою: А - стандартне відхилення (ширина розподілу), В - коефіцієнт асиметрії (симетричність), С- кількість піків, D - кількість аномальних значень.

Симетричні розподіли часто свідчать про стабільні епігенетичні стани, тоді як значна асиметрія може вказувати на епігенетичні порушення, зокрема пов'язані з онкогенезом [55]. Найбільш виражену асиметрію демонстрували: (Рис. 3.8.В):

- SKI: cg11155915
- BRAF: cg10141022
- CCND1: cg07663571, cg16969182

Асиметричне метилювання в ділянках, що регулюють експресію онкогенів (таких як BRAF та CCND1) або генів-супресорів пухлин (SKI), може призводити до їхньої дисрегуляції та сприяти злоякісній трансформації клітин.

Наявність піків у розподілі β -values свідчить про окремі клітинні популяції з підвищеним або зниженим метилюванням, що може

відображати гетерогенність пухлин або молекулярні відмінності клінічних підгруп [56]. Було виявлено такі CpG-сайти з піками (Рис. 3.8.C):

- SKI: cg13400516
- BRAF: cg22271515, cg12859469
- CCND1: cg14513281
- CDK4: cg15857731

Застосування міжквартильного розмаху (IQR) для виявлення аномальних β -значень дозволило виділити екстремальні рівні метилювання, пов'язані з мутаціями або іншими патогенними механізмами [57]. Найбільшу кількість аномальних значень виявлено для CpG-сайтів, асоційованих з геном CCND1: cg05068533, cg07149785, cg11398323, cg15233880, cg19209049.

Ген CCND1 кодує циклін D1 - ключовий регулятор переходу клітини з фази G1 до S, і його дисрегуляція, зокрема через аномальне метилювання регуляторних ділянок, є відомим механізмом в онкогенезі, включаючи меланому [58].

У результаті ми отримали вибірку з 20 CpG-сайтів із найкращими характеристиками метилювання. Було проведено перевірку кореляції між ними з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона. Кореляція показує, наскільки зміни в одному сайті пов'язані зі змінами в іншому. Позитивна кореляція (червоний) означає, що підвищення метилювання в одному сайті супроводжується підвищенням в іншому; негативна (блакитний) — що підвищення одного супроводжується зниженням іншого (Рис. 3.9.).

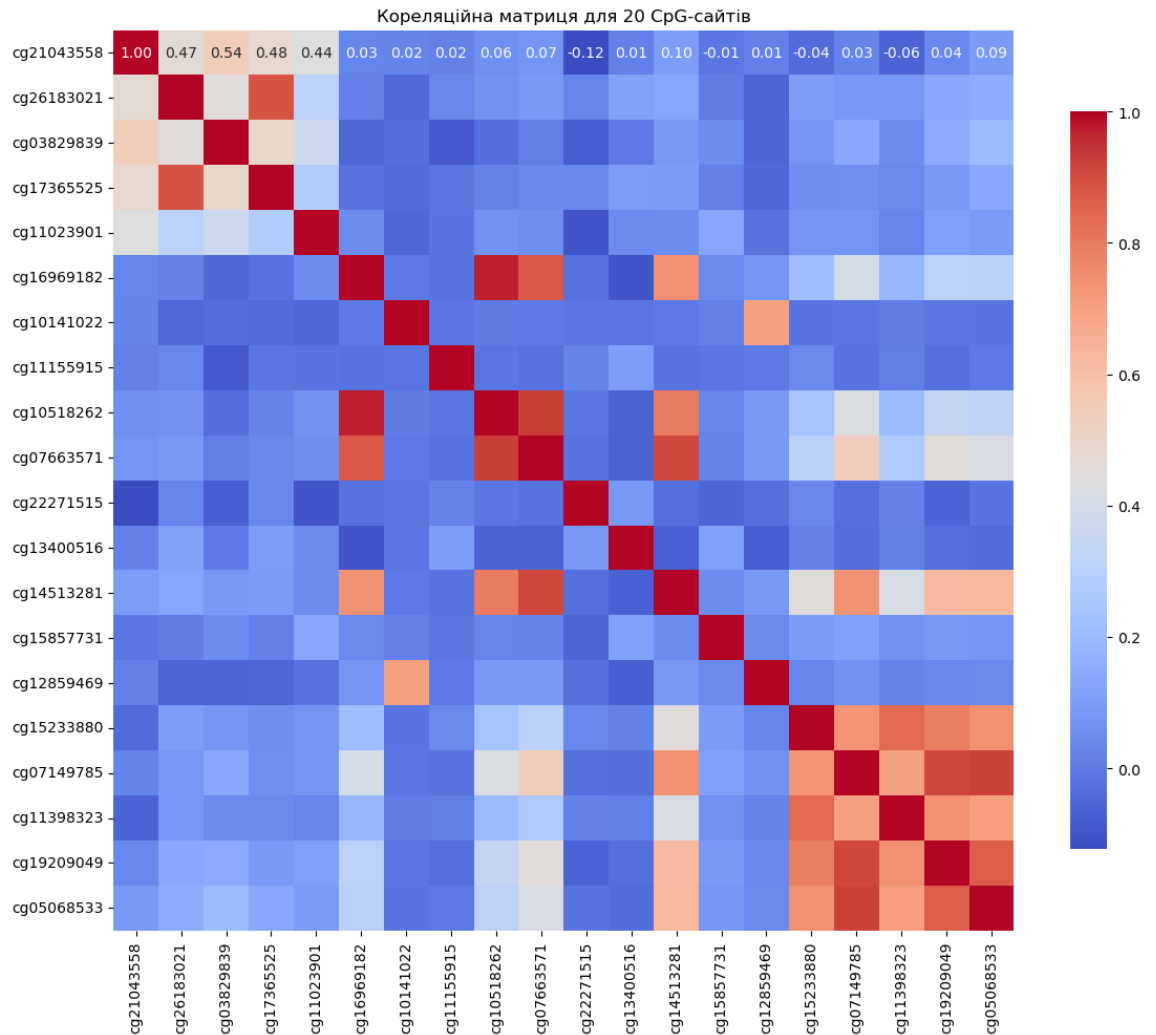


Рис. 3.9. Теплова карта кореляції CpG-сайтів.

Найсильніші позитивні кореляції спостерігались між cg10518262 та cg16969182 ($r = 0.972376$), cg07663571 та cg10518262 ($r = 0.927682$), а також cg05068533 та cg07149785 ($r = 0.923238$). Ці сайти локалізовані у промоторній області або в регуляторних ділянках гена CCND1. Це може свідчити про координацію метилювання в межах одного гена, що підкреслює його потенційне значення у патогенезі меланому.

Найсильніші негативні кореляції зафіксовані між cg22271515 та cg21043558 ($r = -0.122608$), cg22271515 та cg11023901 ($r = -0.099801$), а також cg13400516 та cg16969182 ($r = -0.097273$) спостерігались між CpG-сайтами, що належать до різних онкогенів, зокрема BRAF, SKI, CDK4 та CCND1. Це може вказувати на те, що підвищення метилювання у ділянках

одного гена супроводжується зниженням у іншому, що потенційно відображає протилежні регуляторні впливи або різні механізми залучення до онкогенезу.

На основі зробленого кореляційного аналізу ми виділили два функціональні кластери CpG-сайтів, які демонстрували високий рівень позитивної кореляції ($r > 0.9$): кластер 1 (cg10518262, cg16969182, cg07663571, cg14513281) та кластер 2 (cg05068533, cg07149785, cg19209049). Для кожного кластера було розраховано середнє β -value, що дозволило агрегувати інформацію про спільні регуляторні зміни. Це підвищує стабільність прогнозних моделей, зменшує мультиколінеарність та спрощує подальший статистичний аналіз.

3.2.1. Визначення cut-off

Для ідентифікації CpG сайтів, потенційно пов'язаних з виживаністю при меланомі, було проведено аналіз з використанням медіанного та тертильного порогових значень рівнів метилювання, а також ROC-аналіз для оцінки дискримінаційної здатності CpG сайтів (Таблиця 3.1).

При аналізі виживаності з використанням медіанного порогового значення (cutoff) рівнів метилювання сайт cg10539418 показав найсильнішу асоціацію з часом до події (смерті) при такому розділенні. А при аналізі з використанням тертильних порогових значень, тобто розбиті на три групи за рівнем метилювання, найкращий результат виявився в cg17365525. Цікаво, що було виявлено декілька CpG-сайтів (cg17365525, cg26183021 та cg20409636), які потрапили до топ-5 обох аналізів, отже вони можуть бути надійними маркерами.

Таблиця 3.1

Статистично значущі CpG-сайти, ранжовані за різними методами (ROC, Тертиль, Медіана) для загальної вибірки.

Ранг	ROC (p-value)	Тертиль (p-value)	Медіана (p-value)
1	Cg07231544 (0.000971)	Cg17365525 (0.001540)	Cg10539418 (0.000228)
2	Cg19522332 (0.005830)	Cg24020398 (0.006156)	Cg11190277 (0.000667)
3	Cg07788451 (0.014778)	Cg20409636 (0.008171)	Cg26183021 (0.001690)
4	Cg21640861 (0.015322)	Cg26183021 (0.009309)	Cg17365525 (0.005419)
5	Cg25977744 (0.021537)	Cg11398323 (0.012056)	Cg20409636 (0.005891)

Для оцінки здатності CpG сайтів розрізняти групи виживаності (0 – живі, 1 – мертві), було застосовано ROC-аналіз. Проте лише один CpG-сайт виявився статистично значущим ($p \leq 0.05$), а саме cg07231544.

На основі отриманих даних було створено нову вибірку CpG-сайтів, у яку увійшли:

- cg10539418 і cg11190277 - обидва належать до гена CCND1;
- cg26183021 і cg17365525 - пов'язані з AURKB;
- cg20409636 – асоційований з онкогеном CDK4;
- cg07231544 - пов'язаний з MITF.

Усі ці гени — CDK4, MITF, CCND1, AURKB — є онкогенами, і їхня гіперекспресія або порушення регуляції, зокрема метилювання, може сприяти розвитку та прогресії меланоми.

Для візуалізації патернів їх метилювання було побудовано теплову карту (Рис. 3.10.).

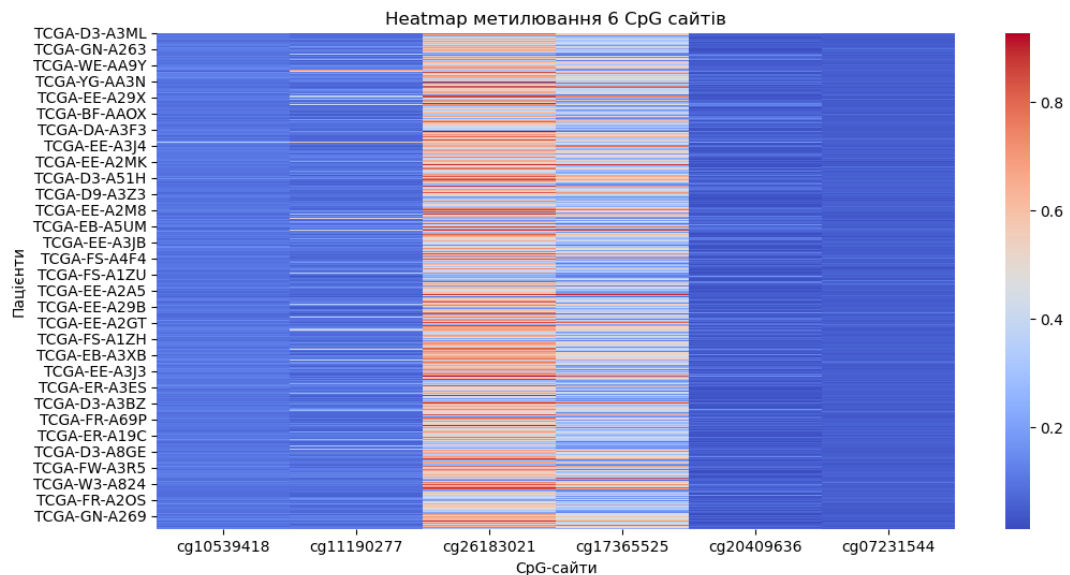


Рис. 3.10. Теплова карта метилювання CpG сайтів у досліджуваній вибірці пацієнтів. Кольорова шкала праворуч відображає рівні метилювання (синій – низький, червоний – високий).

На візуалізації чітко видно, що висока варіабельність метилювання для cg17365525 та cg26183021 підтверджує їх здатність розділяти пацієнтів на групи з різним прогнозом. Сайт cg11190277 також має схожі патерни, проте значно менш виражені.

Далі для кожного з цих сайтів ми розрахували порогове значення (cut-off) як медіану β -values серед усіх пацієнтів. Пацієнти були класифіковані на групи high methylation ($\beta \geq$ медіана) та low methylation ($\beta <$ медіана). Медіана була обрана оскільки вона стійка до викидів (outliers), на відміну від середнього, яке може

сильно зміститися через декілька аномальних значень. Такий підхід дозволяє нам забезпечити рівномірний розподіл спостережень між групами для подальших асоціативних аналізів, зокрема, аналізу виживаності методом Каплана–Мейєра.

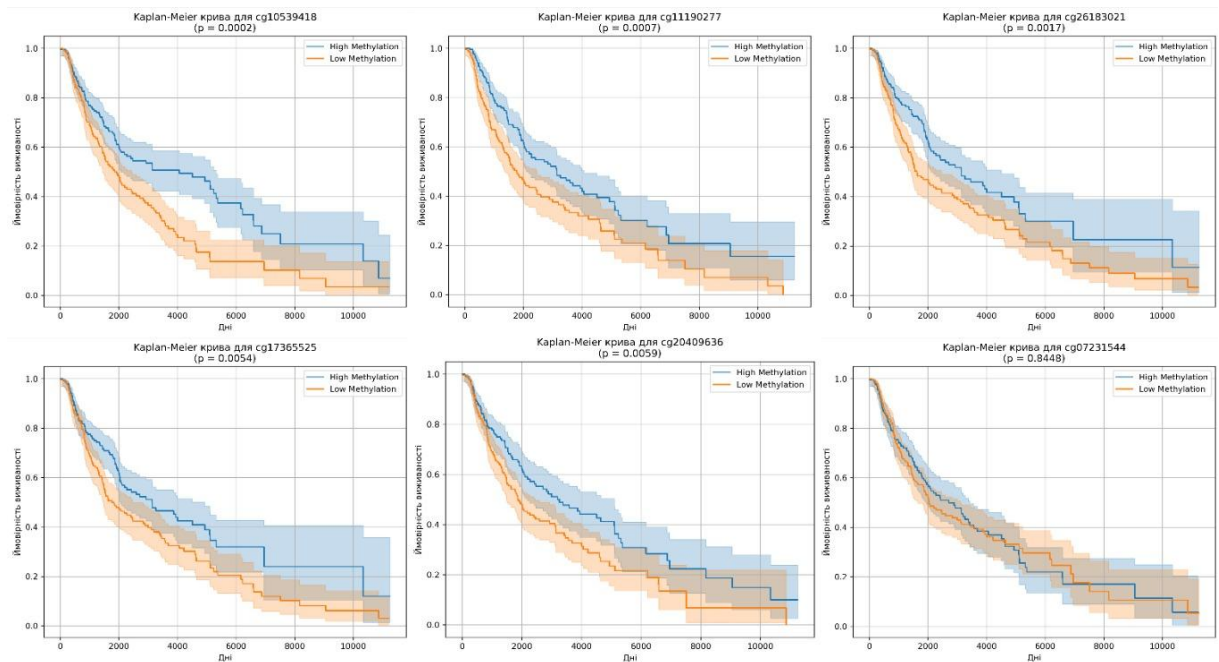
3.3. Аналіз виживаності

3.3.1 Аналіз Каплана–Мейєра

Для визначення CpG-сайтів, пов'язаних із прогнозом захворювання, було проведено аналіз Каплана–Мейєра з log-rank тестом для кожного CpG-сайту з вибірки (Рис. 3.11.). Отримані p-value показали, що кілька сайтів демонструють статистично значущі відмінності у виживаності між групами з високим та низьким рівнем метилювання.

Найнижчі p-value спостерігались для:

- **cg10539418** ($p = 0.0002$), ген CCND1;
- **cg11190277** ($p = 0.0007$), ген CCND1;



- **cg26183021** ($p = 0.0017$), ген AURKB.

Рис. 3.11. Криві виживаності Каплана-Маєра, стратифіковані за медіанним рівнем метилювання

Ці CpG-сайти можна вважати перспективними кандидатами на роль прогностичних біомаркерів, оскільки вони демонструють значущу кореляцію між рівнем метилювання та виживаністю пацієнтів.

3.3.2. Побудова моделі Кокса та оптимізація змінних

Для оцінки впливу клінічних характеристик (вік, стать) та рівнів метилювання окремих CpG-сайтів на виживаність пацієнтів із меланою була побудована багатофакторна модель регресії Кокса. Основні параметри моделі включали коефіцієнти (coef), hazard ratio ($\exp(\text{coef})$), стандартні помилки, довірчі інтервали (95% CI) та p-value (Рис. 3.12.).

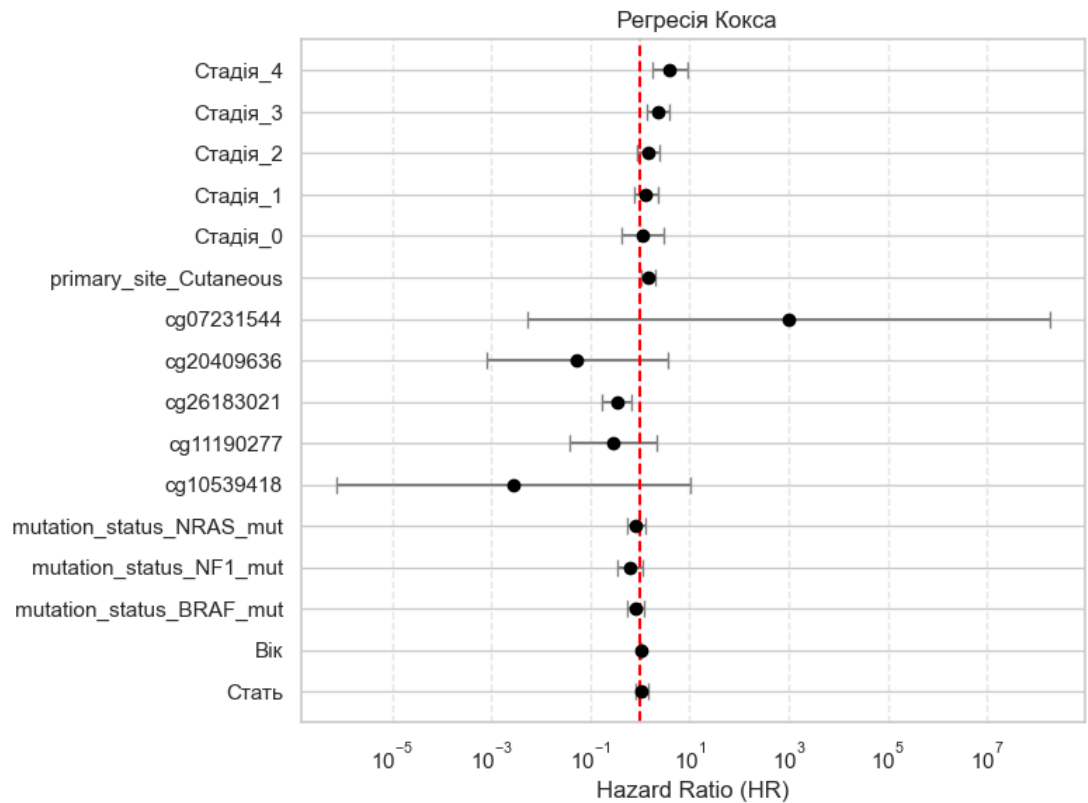


Рис. 3.12. Вплив окремих коваріат на коефіцієнт ризику (HR) смерті з 95% довірчими інтервалами.

Первинний набір ознак включав клінічні характеристики (вік, стать, стадія захворювання), мутаційний статус (BRAF, NRAS, NF1, WT), локалізацію первинної пухлини, а також рівні метилювання CpG-сайтів (cg10539418, cg11190277, cg26183021, cg20409636, cg07231544, cg17365525).

Для зниження мультиколінеарності, яка зменшує стабільність та інтерпретованість моделі, ми обчислили фактор інфляції дисперсії (VIF). Таким чином, було визначено, що mutation_status_WT -це базова категорія мутаційного статусу, що не надає незалежної інформації. Стадія_Невідомо - невелика вибірка (10% від загальної), яка також показала високий ступінь мультиколінеарності. CpG - сайт cg17365525 показав високу кореляцію з cg26183021, вони обидва знаходяться в промоторній ділянці гену *AURKB*, тому cg17365525 був видалений.

Також для зменшення кількості категорій локалізації пухлини, усі первинні локалізації було агреговано до групи `primary_site_Cutaneous` (шкіра) та `primary_site_Non-cutaneous`, з подальшим кодуванням і вибором лише одного предиктора (`primary_site_Cutaneous`) для моделі (інше стало базовою групою).

На основі кінцевої вибірки з коваріатами, було побудовано модель Кокса на 462 пацієнтах (222 події смерті). Результати моделі Кокса (Рис. 3.12.):

- **Вік**

Коефіцієнт: 0.03

HR: 1.03

$p < 0.005$

Зі збільшенням віку на 1 рік ризик смерті зростає на 3%. Це статистично значуща змінна, що свідчить про негативний вплив віку на виживаність.

- **Стать**

Коефіцієнт: 0.07

HR: 1.07

$p: 0.65$ (не значуща)

HR > 1 вказує на трохи підвищений ризик смерті для чоловіків, але ця різниця є випадковою за статистикою.

- **`mutation_status_BRAF_mut`**

Коефіцієнт: -0.21

HR: 0.81

p: 0.31 (не значуща)

Наявність мутації в BRAF дещо знижує ризик смерті, але ефект статистично не значущий. Можливо, через компенсацію іншими предикторами або невелику вибірку.

- **mutation_status_NF1_mut**

Коефіцієнт: -0.47

HR: 0.63

p: 0.12 (не значуща)

Мутація в NF1 асоціюється з потенційно кращим прогнозом, але не досягає статистичної значущості.

- **mutation_status_NRAS_mut**

Коефіцієнт: -0.19

HR: 0.82

p: 0.37 (не значуща)

Мутація NRAS також асоціюється з невеликим зниженням ризику, однак не є значущою змінною.

- **cg10539418**

Коефіцієнт: -5.86

HR: ≈ 0

p: 0.16

Сильне негативне значення свідчить про зниження ризику смерті при високому метилюванні. Але через високу стандартну помилку ($SE = 4.19$) результат не надійний.

- **cg11190277**

Коефіцієнт: -1.23

HR: 0.29

p: 0.23

Метилювання на цьому сайті теж потенційно захисне, але статистично не значуще.

- **cg26183021**

Коефіцієнт: -1.08

HR: 0.34

p < 0.005

Підвищене метилювання цього CpG пов'язане зі зниженим ризиком смерті. Можливий зв'язок із епігенетичною регуляцією гена AURKB.

- **cg20409636**

Коефіцієнт: -2.92

HR: 0.05

p: 0.18

Може бути сильним предиктором, але з високою помилкою і невизначеним довірчим інтервалом. Статистично не значущий.

- **cg07231544**

Коефіцієнт: 6.88

HR: 972.65

p: 0.27

Надвисоке HR і велика SE (6.19) свідчать про ненадійність цієї змінної.

- **primary_site_Cutaneous**

Коефіцієнт: 0.40

HR: 1.49

p: 0.01

Локалізація пухлини в шкірі статистично значущо асоціюється з вищим ризиком смерті порівняно з іншими локалізаціями.

- **Стадія_0, Стадія_1, Стадія_2**

Ці стадії мають коефіцієнти 0.12, 0.26, 0.37, та HR показник 1.13, 1.30, 1.45 відповідно. Це вказує на незначне підвищення ризику смерті у пацієнтів з цими стадіями у порівнянні з базовою (Стадія_Невідомо).

- **Стадія_3**

Коефіцієнт: 0.84

HR: 2.32

$p < 0.005$ (значущий)

Ці показники вказують на значне підвищення ризику події у пацієнтів з 3 стадією порівняно з базовою.

- **Стадія_4**

Коефіцієнт: 1.39

HR: 4.03

$p < 0.005$ (значущий)

Ці показники вказують на дуже значне підвищення ризику події у пацієнтів з 4 стадією порівняно з базовою стадією.

Найбільший вплив на підвищення ризику події мають пізні стадії захворювання (3 та 4) та первинна локалізація на шкірі. Збільшення віку також пов'язане зі статистично значущим підвищенням ризику. З іншого боку, збільшення метилювання CpG сайту cg26183021, ген AURKB, пов'язане зі статистично значущим зниженням ризику події. Вплив статі та досліджуваних мутацій не є статистично значущим. Взаємодія BRAF $\times$ Stage3 не покращила предиктивність, і не була значущою ($p = 0.68$).

3.4. Кореляційний аналіз

Для виявлення потенційних взаємозв'язків між рівнями метилювання цільових CpG-сайтів та клініко-генетичними характеристиками пацієнтів з меланомою була побудована матриця кореляцій (Рис. 3.13.). Аналіз охоплював п'ять CpG-сайтів (cg10539418, cg11190277, cg26183021, cg20409636, cg07231544) та змінні: мутаційний статус BRAF, NRAS, NF1; локалізацію первинного біозразка (primary_site_Cutaneous), стадію захворювання (Стадія_0–4), стать та вік пацієнта.

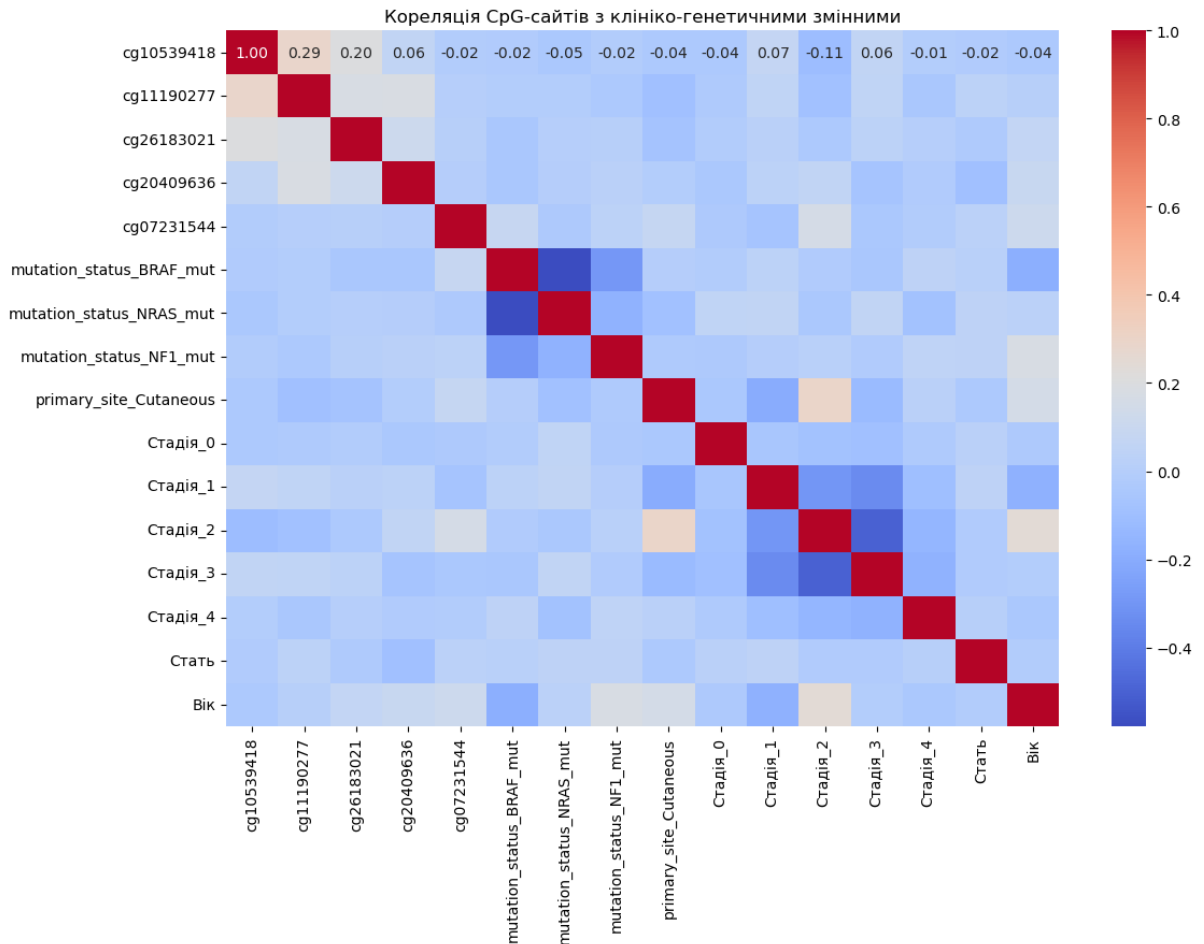


Рис. 3.13. Теплова карта кореляцій між CpG-сайтами та клініко-генетичними характеристиками.

Було визначено, що між CpG-сайтами cg10539418 та cg11190277, cg10539418 та cg26183021, є помірна позитивна кореляція 0.29 та 0.20, відповідно. Це може свідчити про ко-регуляцію метилування у даних ділянках або близьке функціональне розташування у геномі. Що справдилося, бо cg10539418 та cg11190277 — це промотори гену CCND1, регулятора клітинного циклу. Позитивну кореляцію між cg10539418 (CCND1) та cg26183021 (AURKB) можна пояснити тим, що вони можуть мати спільні механізми регуляції, оскільки ці гени, безпосередньо, контролюють клітинний цикл, то зміни в їх метилуванні можуть призвести до пухлинного росту.

Загалом CpG-сайти не демонструють сильного зв'язку з мутаційним статусом NRAS, BRAF чи NF1, окрім cg26183021, який слабо-негативно

корелює з BRAF. Це може свідчити про потенційну зворотну епігенетичну регуляцію між цими компонентами клітинного циклу.

Дослідження показують, що у злоякісних клітинах меланоми, особливо при наявності мутації BRAF, відбувається значне прискорення клітинного поділу [59]. А для того щоб підтримувати високий темп проліферації необхідне ефективне функціонування мітотичного апарату, саме для цього потрібна збільшена експресія гену AURKB, який може виступати як адаптаційний механізм, що дозволяє клітині успішно пройти мітоз, незважаючи на надмірну проліферативну активність, через активацію BRAF.

Аналогічно з стадіями, всі CpG-сайти мають слабкий або відсутній зв'язок з ними, тобто зміни в метилюванні не прямо залежать від клінічної стадії захворювання.

Сильних кореляцій також не було виявлено між рівнями метилювання та віком або статтю, найвищий результат показали cg11190277 та вік, проте кореляція не перевищує -0.02.

Цікаво, що локалізація пухлини негативну кореляцію з Стадією_1, а з Стадією_2 позитивно. Це може свідчити про частіше виявлення шкірних форм меланоми на 2-й стадії, або особливості діагностичної практики, де ураження шкіри виявляються вже у прогресивніших випадках.

Метилювання в промоторах генів CCND1 та AURKB демонструє певну кореляцію як між CpG-сайтами, так і з мутаційним статусом, що підтверджує їхню роль у патогенезі меланоми. Проте їхній зв'язок із клініко-генетичними характеристиками (включаючи мутаційний статус і стадію захворювання) є слабким, що підкреслює незалежність CpG-профілю від загального клінічного статусу і потенційно високу прогностичну цінність саме CpG-сайтів при побудові моделей виживаності. Також, зв'язок між локалізацією первинної пухлини та стадіями хвороби

вартий подальшого дослідження, оскільки може впливати на час діагностики та стратегію лікування.

3.5. Класифікаційна модель RandomForest

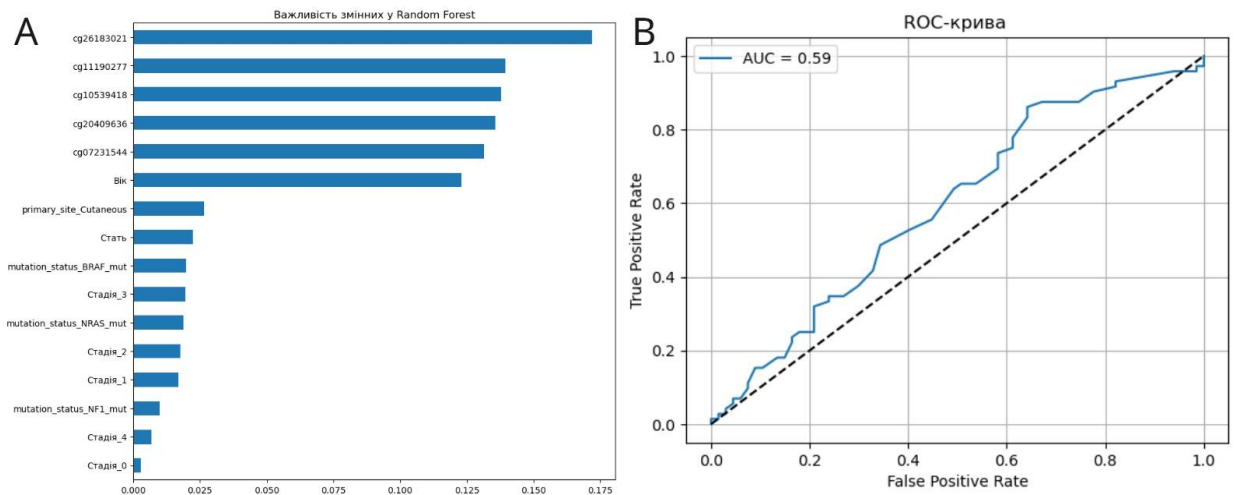
Було побудовано модель Random Forest для бінарної класифікації, де цільовою змінною виступає факт виживання пацієнтів (вижив/помер). До набору предикторів увійшли клінічні змінні (вік, стать, стадія захворювання, локалізація біозразка, мутаційний статус) та метилювання CpG-сайтів, тобто та ж сама вибірка, що і до регресійної моделі Кокса.

Модель було навчено на 70% даних, а її ефективність перевірено на тестовій вибірці (30%) з використанням метрики ROC-AUC. Отримане значення AUC склало 0.59, що свідчить про обмежену предиктивну здатність моделі, яка лише незначно перевищує випадкове вгадування ($AUC = 0.5$). Додатково, асигасу моделі становила 53%, F1-показник — 0.52, а recall для пацієнтів, що померли, був лише 38%, що вказує на складність моделі в ідентифікації високоризикових пацієнтів.

Для інтерпретації прогностичної ваги окремих ознак було побудовано графік важливості ознак (Рис. 3.14. (А)). Найбільш вагомими предикторами виявилися такі CpG-сайти:

- cg26183021 — розташований у промоторній ділянці онкогена AURKB, продемонстрував найвищу вагу серед усіх ознак;
- cg10539418 і cg11190277 — обидва пов'язані з промотором гена CCND1, провідного регулятора клітинного циклу;

- клінічні змінні — такі як вік та локалізація біозразка (primary_site_Cutaneous) також увійшли до переліку найбільш значущих



ознак.

Рис. 3.14. (А) Ранжування змінних за їх внеском у прогнозування в моделі Random Forest. (В) Характеристика робочої кривої приймача (ROC) для оцінки ефективності класифікації моделі Random Forest.

Мутаційний статус генів BRAF, NRAS та NF1 попри свою біологічну значущість, мав відносно нижчу інформативність у класифікаційній моделі. Це може бути пов'язано з тим, що Random Forest не враховує часову компоненту, і мутації, ймовірно, впливають не лише на сам факт смерті, а й на її часову перспективу.

Таким чином, результати класифікації підтверджують значущість епігенетичних змін у промоторних ділянках цільових онкогенів як потенційних біомаркерів ризику.

3.5.1. Оптимізація моделі виживаності

На основі отриманих результатів з кореляційного аналізу та моделі Random Forest, було створено експериментальну оптимізовану модель виживаності з додаванням нових взаємодій між змінними:

- $\text{cg26183021} \times \text{mutation_status_BRAF_mut}$
- $\text{cg10539418} \times \text{Стадія_3}$
- $\text{cg11190277} \times \text{primary_site_Cutaneous}$

Додавання нової змінної `methylation_cluster`, у який увійшли усі CpG-сайти, а також застосовано регуляризацию ($\text{penalizer} = 0.1$).

Проте модифікації не призвели до покращення прогнозу:

- Індекс узгодженості (C-index) залишився на рівні 0.69 в обох моделях, що вказує на однакову передбачувальну здатність.
- Критерій AIC для оптимізованої моделі збільшився (2267.94 проти 2246.18 у базовій), що свідчить про зниження модельної ефективності.
- Жодна з додаткових змінних у новій моделі не досягла статистичної значущості (усі $p > 0.1$).
- Зростання кількості параметрів ($df = 20$ замість 16) призвело до ускладнення моделі без підвищення її точності.

Тому, початкова модель була залишена як основна для подальшої інтерпретації результатів, оскільки вона забезпечує оптимальний баланс між складністю, точністю та інтерпретованістю. Розширена модель була розглянута як експериментальна спроба врахування потенційних взаємодій та кластерних ознак, проте її метрики не продемонстрували переваг, і тому вона не була обрана для фінального аналізу.

3.6. Інтерпретація моделі за допомогою Explainable AI

Для того щоб проаналізувати внесок кожного з параметрів у результат моделі виживаності, було застосовано методи інтерпретованого

машинного навчання (Explainable AI, XAI). А саме, за допомогою бібліотеки SHAP (SHapley Additive exPlanations), яка ґрунтується на концепції Шеплієвих значень із теорії ігор.

Метод SHAP надає змогу оцінити які змінні є ключовими для прогнозу, а також їх індивідуальний вплив у кожному конкретному випадку. Це особливо важливо в медичних задачах, де не лише точність, а й прозорість рішення моделі має велике значення для клінічного застосування.

Положення кожної точки вздовж горизонтальної осі (Рис. 3.15.) вказує на величину впливу ознаки на прогноз моделі для кожного пацієнта, причому її положення по горизонталі відображає силу цього впливу: позитивні значення свідчать про збільшення ймовірності смерті, тоді як негативні — про її зменшення. Колір точки вказує на відповідне значення ознаки для конкретного пацієнта, де синій колір - низьке значення, а червоний — на високе. Ознаки на графіку впорядковані за їхньою середньою абсолютною SHAP-величиною, що відображає їхню загальну істотність для моделі.

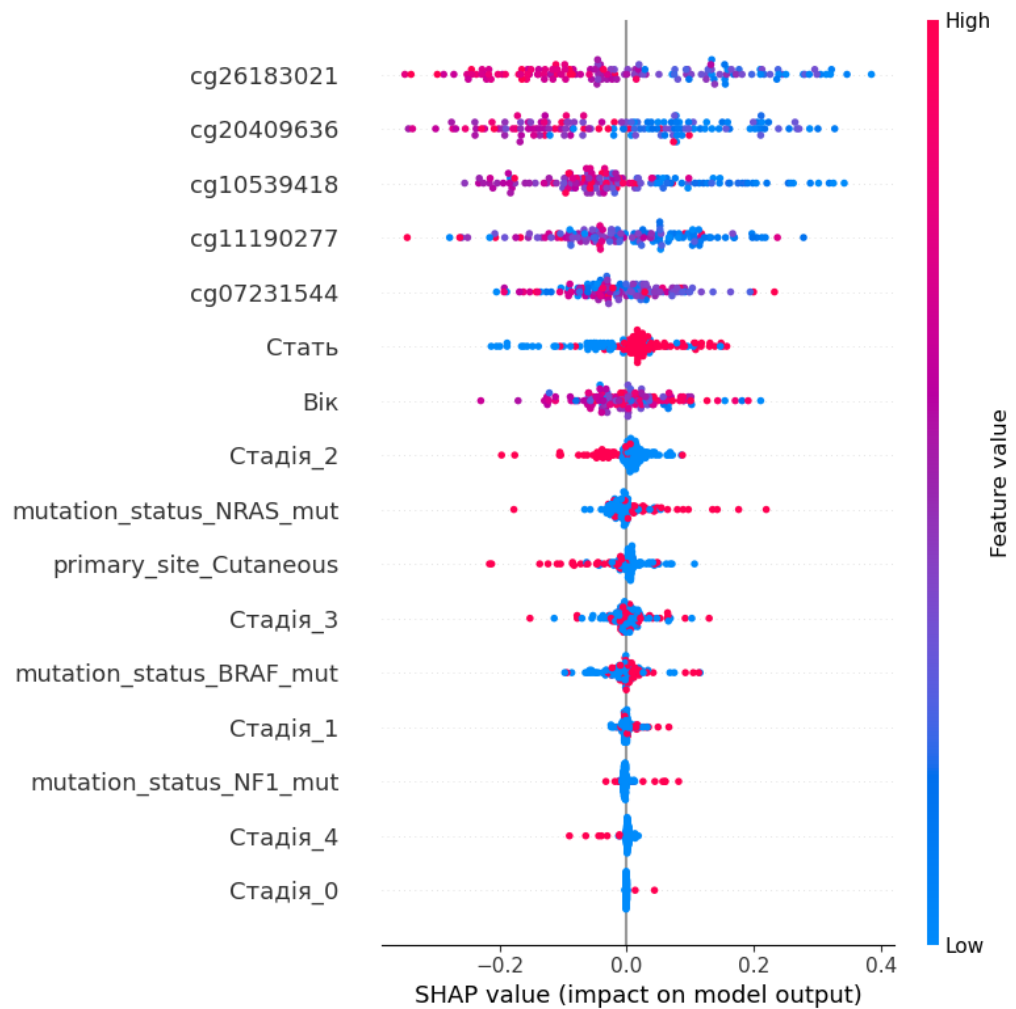


Рис. 3.15. Інтерпретація моделі випадкового лісу: Важливість ознак (SHAP)

Згідно з візуалізацією (Рис. 3.15.) найбільший середній абсолютний вплив на прогноз моделі мають усі CpG-сайти (зокрема, cg20409636, cg26183021, cg11190277, cg10539418, cg07231544), вік пацієнта та стать.

Наглядно можна побачити, що високий рівень метилювання CpG-сайтів асоціюється зі зменшенням вірогідності смерті, а низький, навпаки з високою смертністю. Особливо чітко це визначається на cg20409636, cg26183021, cg11190277 та cg10539418, у той час як cg07231544 має більш широкі викиди.

Старший вік пацієнта (червоні точки, зміщені вправо) демонструє тенденцію до збільшення ймовірності смерті, у той час як молодший вік дає кращу виживаність.

При кодуванні стать бінаризувалася (0 - жінки, 1- чоловіки), тому на зображенні блакитний це жінки, а червоний - чоловіки. Згідно з розподілом точок на графіку, чоловіча стать демонструє тенденцію до збільшення ймовірності летального результату, а жіноча, навпаки, зменшення.

Аналізуючи розташування червоних точок для ознак Стадія_2 та Стадія_4, можна помітити, що вони переважно знаходяться у лівій, негативній частині графіка SHAP-значень. Це свідчить про те, що високі значення (наявність) пізніх стадій захворювання насправді пов'язані зі зменшенням ймовірності летального результату, тобто з підвищенням шансів на виживання за прогнозом моделі.

На противагу цьому, сині точки для цих ознак (що відображають відсутність пізніх стадій) знаходяться переважно у правій, позитивній частині графіка, вказуючи на збільшення ймовірності летального результату при відсутності пізніх стадій, що є контрінтуїтивним і потребує подальшого вивчення. оскільки за загальними медичними уявленнями пізні стадії захворювання (особливо стадія 4) зазвичай асоціюються з гіршим прогнозом.

Можливе пояснення цього результату, це те що кількість пацієнтів на Стадія_4 була недостатньою для навчання надійної залежності (22 пацієнти з 462). Тоді як для Стадія_2, модель випадкового лісу можливо виявила нелінійну залежність або складну взаємодію між стадією захворювання та іншими ознаками, що призвело до такого неочікуваного зв'язку. Або серед пацієнтів з діагностованою Стадія_2 траплялися підгрупи з кращою відповіддю на терапію або з менш агресивними формами пухлини, що

могло вплинути на реальний клінічний результат і, відповідно, на навчання моделі.

Вплив мутацій BRAF та NRAS є більш однозначним, оскільки більшість червоних точок знаходяться праворуч, тобто їх наявність призводить до більш вірогідного летального результату.

Первинна локалізація пухлини на шкірі (переважно сині точки, зміщені вліво) демонструє тенденцію до зменшення ймовірності смерті, хоча вплив цієї ознаки є меншим порівняно з іншими.

Для більш глибокого розуміння взаємозв'язків між окремими предикторами та результатом моделі було проведено аналіз залежностей SHAP-значень від фактичних значень ознак, з урахуванням можливих ефектів взаємодії між змінними.

На Dependence Plot (Рис. 3.16.A) зображено SHAP-залежність ознаки Вік з урахуванням метилювання cg07231544. Основна кількість пацієнтів з діагностованою меланомою мають вік від 40 до 80 років, з підвищеним SHAP-значенням, у той час як у більш молодших пацієнтів наявна краща виживаність. Наявна також кореляція з cg07231544: при однаковому віці пацієнти з вищим метилюванням мають більш негативний прогноз.

СрG -сайт cg07231544 знаходиться в промоторній ділянці гену MITF, який відповідає за регуляцію диференціації меланоцитів та експресію ферментів, які залучені у синтез меланіну. Дослідження Carreira S., та інших показало, що при надмірній експресії MITF відбувається зупинка клітинного циклу в G1-фазі, це супроводжується індукцією старіння та посиленням диференціації, що у підсумку зупиняє проліферацію клітин меланоми [60]. Згідно з отриманими даними можна припустити, що при гіперметилюванні промотору MITF, відбувається зниження активності MITF і це призводить до збільшення інвазивності меланоми та більшої вірогідності смерті.

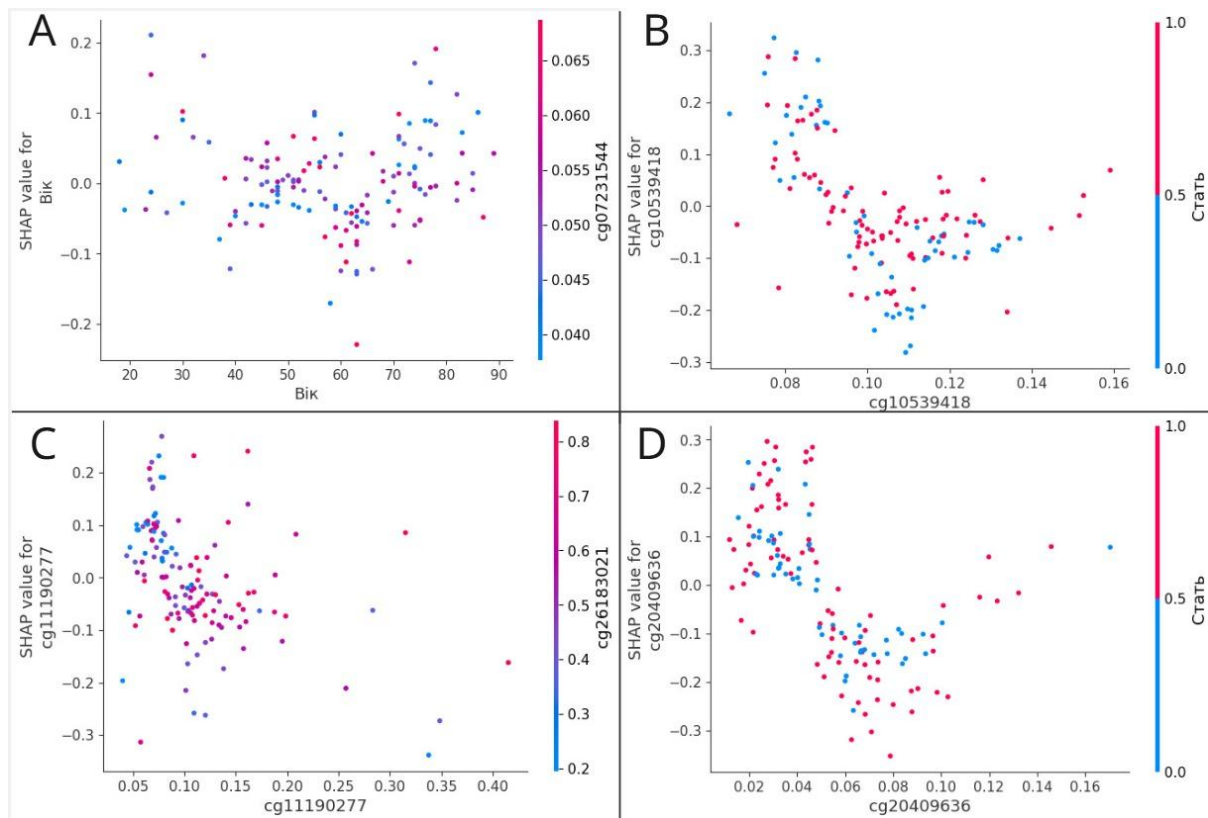


Рис. 3.16. SHAP-залежності ознак моделі виживаності

Другий графік (Рис. 3.16.B) з SHAP-залежністю *cg10539418* з урахуванням статі (синій — жінка, червоний — чоловік), демонструє, що при однаковому рівні метилювання чоловіки мають тенденцію до вищого ризику смерті.

Третій графік (Рис. 3.16.C), на якому візуалізовано SHAP-залежність *cg11190277* з урахуванням рівня метилювання *cg26183021*. При низьких показниках метилювання *cg26183021* та *cg11190277*, ризик негативного прогнозу зростає, однак при одночасному збільшенні рівня метилювання CpG-сайтів, прогноз виживаності покращується.

На четвертому графіку (Рис. 3.16.D) SHAP-залежності *cg20409636* з урахуванням статі, очевидно, що при зростанні показника метилювання CpG-сайту *cg20409636*, SHAP-значення стає від'ємним, тобто ймовірність виживаності зростає, особливо серед чоловіків (червоний).

Результати SHAP-аналізу підтвердили провідну роль епігенетичних маркерів, зокрема рівнів метилювання CpG-сайтів (cg20409636, cg26183021, cg11190277), як найбільш вагомих предикторів у моделі. Високий рівень метилювання на цих сайтах здебільшого асоціюється з підвищеною виживаністю, тоді як зниження метилювання — з гіршим прогнозом.

Крім того, було виявлено, що вік і стать також мають значущий вплив на модель: старший вік та чоловіча стать корелюють із вищою імовірністю летального результату. Однак при детальнішому аналізі взаємодій змінних виявлено складні залежності — наприклад, взаємодія між віком і рівнем метилювання cg07231544, яка змінює напрям впливу ознаки. Такі перехресні взаємозв'язки демонструють доцільність багатовимірної підходу при інтерпретації результатів.

Цікавим спостереженням стало контрінтуїтивне зниження ризику смерті при наявності 2-ї та навіть 4-ї стадії захворювання за прогнозом моделі, це свідчить про потенційні упередження моделі та вказує на потребу в подальшій валідації результатів на незалежних когортних даних.

Узагальнюючи, SHAP-аналіз зміг не лише підтвердити відомі епігенетичні маркери, які вже раніше описувалися в літературі як прогностично важливі, а й виявити низку нових змінних, які могли взаємодіяти між собою несподіваним чином. Наприклад, поєднання віку пацієнта із рівнем метилювання в локусі cg07231544 (MITF) показало помітний вплив на модель, хоча окремо ці змінні не мали критичного значення. Такий підхід значно покращив інтерпретованість результатів, наближаючи модель до практичного застосування у клінічній практиці - в оцінці індивідуального прогнозу для пацієнтів з меланомою.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеного дослідження досягнуто поставленої мети — оцінено потенціал рівня метилювання ДНК як біомаркера прогнозу виживаності пацієнтів з меланомою шкіри в контексті вікової та клініко-генетичної, епігенетичної регуляції. CpG-сайти cg20409636, cg26183021, cg11190277, cg10539418 та cg07231544, які асоційовані з промоторними ділянками ключових онкогенів (CDK4, AURKB, CCND1, MITF), продемонстрували найбільший вплив на прогноз виживаності згідно з SHAP-аналізом моделі Random Forest, а також підтвердили статистичну значущість у регресії Кокса.

1. Здійснено успішну інтеграцію метиломних, клінічних та генетичних даних для пацієнтів з меланомою (n=462). Створено високоякісний датасет для подальшого аналізу.

2. Ідентифіковано CpG-сайти в промоторних ділянках 16 генів-мішеней, серед яких найбільше значення мають cg20409636, cg26183021, cg11190277 та cg07231544.

3. Побудовано модель Кокса (C-index=0.69) за допомогою якої було визначено вплив віку, стадії захворювання, локалізації пухлини та метилювання на прогноз. CpG-сайт cg26183021 (ген AURKB) продемонстрував статистично значущий захисний ефект ($p < 0.005$), а модель Random Forest показала найвищу прогностичну вагу цього локуса. При цьому рівень метилювання cg07231544 (ген MITF) виявився найзначущішим у ROC-аналізі ($p \leq 0.05$), а SHAP-

залежність підтвердила його негативний вплив у поєднанні з віком.

4. SHAP-аналіз виявив складні взаємодії між рівнем метилювання та віком, статтю, що дозволяє зробити модель інтерпретованою для клінічного використання. Зокрема:

- встановлено, що у пацієнтів віком 40–80 років з гіперметилюванням cg07231544 прогноз є гіршим, що узгоджується з дослідженнями щодо функції MITF як «реостата» проліферації;
- взаємодія між рівнем метилювання та статтю вказала на відмінності між чоловіками та жінками у впливі тих самих CpG-сайтів на виживаність;
- було виявлено помірну кореляцію між cg10539418 та cg26183021), що може свідчити про ко-регуляцію генів клітинного циклу;
- також було знайдено слабку негативну кореляцію між cg26183021 та мутаційним статусом BRAF, через що можна припустити зворотну епігенетичну адаптацію клітин, а саме активація BRAF потребує ефективного мітозу, що може досягатися через гіпометилювання онкогену AURKB.
- у деяких випадках було виявлено контрінтуїтивні залежності (наприклад, у стадії 2 та 4), що можуть бути зумовлені розміром вибірки або комплексною біологічною взаємодією.

Таким чином, рівень метилювання CpG-сайтів у промоторних регіонах онкогенів та генів-супресорів, у поєднанні з віковими та клініко-генетичними характеристиками, може бути використаний для формування індивідуального ризик-профілю пацієнтів з меланомою. Це відкриває перспективи для розвитку персоналізованої прогностичної системи, що враховує як генетичні, так і епігенетичні особливості захворювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Mattei, A.L.; Bailly, N.; Meissner, A. DNA Methylation: A Historical Perspective. *Trends Genet.* **2022**, *38*, 676–707, doi:10.1016/j.tig.2022.03.010.
2. Tompkins, J.D. Discovering DNA Methylation, the History and Future of the Writing on DNA. *J. Hist. Biol.* **2022**, doi:10.1007/s10739-022-09691-8.
3. 5-Azacytidine: Mechanism of Action AND Mechanism of Resistance_Chemicalbook Available online: <https://www.chemicalbook.com/article/5-azacytidine-mechanism-of-action-and-mechanism-of-resistance.htm> (accessed on 10 February 2025).
4. Andergassen, D.; Smith, Z.D.; Kretzmer, H.; Rinn, J.L.; Meissner, A. Diverse Epigenetic Mechanisms Maintain Parental Imprints within the Embryonic and Extraembryonic Lineages. *Dev. Cell* **2021**, *56*, 2995–3005.e4, doi:10.1016/j.devcel.2021.10.010.
5. Fu, S.; Wu, H.; Zhang, H.; Lian, C.G.; Lu, Q. DNA Methylation/Hydroxymethylation in Melanoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 78163–78173, doi:10.18632/oncotarget.18293.
6. Yarychkivska, O.; Shahabuddin, Z.; Comfort, N.; Boulard, M.; Bestor, T.H. BAH Domains and a Histone-like Motif in DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) Regulate de Novo and Maintenance Methylation in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 19466–19475, doi:10.1074/jbc.RA118.004612.
7. Watanabe, R.; Nakachi, Y.; Matsubara, H.; Ueda, J.; Ishii, T.; Ukai, W.; Hashimoto, E.; Kasai, K.; Simizu, S.; Kato, T.; et al. Identification of Epigenetically Active L1 Promoters in the Human Brain and Their Relationship with Psychiatric Disorders. *Neurosci. Res.* **2023**, *195*, 37–51, doi:10.1016/j.neures.2023.05.001.
8. Xiao, C.-L.; Zhu, S.; He, M.; Chen, D.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Yu, G.; Liu, J.; Xie, S.-Q.; Luo, F.; et al. N6-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome. *Mol. Cell* **2018**, *71*, 306–318.e7,

doi:10.1016/j.molcel.2018.06.015.

9. Chen, L.; Ganz, P.A.; Sehl, M.E. DNA Methylation, Aging, and Cancer Risk: A Mini-Review. *Front. Bioinforma.* **2022**, *2*, 847629, doi:10.3389/fbinf.2022.847629.

10. Yu, M.; Hazelton, W.D.; Luebeck, G.E.; Grady, W.M. Epigenetic Aging: More Than Just a Clock When It Comes to Cancer. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 367–374, doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0924.

11. Horvath, S. Erratum to: DNA Methylation Age of Human Tissues and Cell Types. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 96, doi:10.1186/s13059-015-0649-6.

12. Jiang, S.; Guo, Y. Epigenetic Clock: DNA Methylation in Aging. *Stem Cells Int.* **2020**, *2020*, 1–9, doi:10.1155/2020/1047896.

13. Schmitt, K.; Molfenter, B.; Laureano, N.K.; Tawk, B.; Bieg, M.; Hostench, X.P.; Weichenhan, D.; Ullrich, N.D.; Shang, V.; Richter, D.; et al. Somatic Mutations and Promotor Methylation of the Ryanodine Receptor 2 Is a Common Event in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *145*, 3299–3310, doi:10.1002/ijc.32481.

14. Zha, S.; Li, Z.; Chen, S.; Liu, F.; Wang, F. MeCP2 Inhibits Cell Functionality through FoxO3a and Autophagy in Endothelial Progenitor Cells. *Aging* **2019**, *11*, 6714–6733, doi:10.18632/aging.102183.

15. Sanokawa-Akakura, R.; Akakura, S.; Ostrakhovitch, E.A.; Tabibzadeh, S. Replicative Senescence Is Distinguishable from DNA Damage-Induced Senescence by Increased Methylation of Promoter of rDNA and Reduced Expression of rRNA. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *183*, 111149, doi:10.1016/j.mad.2019.111149.

16. Adelman, E.R.; Huang, H.-T.; Roisman, A.; Olsson, A.; Colaprico, A.; Qin, T.; Lindsley, R.C.; Bejar, R.; Salomonis, N.; Grimes, H.L.; et al. Aging Human Hematopoietic Stem Cells Manifest Profound Epigenetic Reprogramming of Enhancers That May Predispose to Leukemia. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 1080–1101, doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1474.

17. Holland, E.A.; Lo, S.; Kelly, B.; Schmid, H.; Cust, A.E.; Palmer,

J.M.; Drummond, M.; Hayward, N.K.; Pritchard, A.L.; Mann, G.J. FRAME: Familial Risk Assessment of Melanoma—a Risk Prediction Tool to Guide CDKN2A Germline Mutation Testing in Australian Familial Melanoma. *Fam. Cancer* **2021**, *20*, 231–239, doi:10.1007/s10689-020-00209-x.

18. Kreuger, I.Z.M.; Slieker, R.C.; van Groningen, T.; van Doorn, R. Therapeutic Strategies for Targeting *CDKN2A* Loss in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2023**, *143*, 18-25.e1, doi:10.1016/j.jid.2022.07.016.

19. Ince, F.A.; Shariev, A.; Dixon, K. PTEN as a Target in Melanoma. *J. Clin. Pathol.* **2022**, *75*, 581–584, doi:10.1136/jclinpath-2021-208008.

20. Roh, M.R.; Gupta, S.; Park, K.-H.; Chung, K.Y.; Lauss, M.; Flaherty, K.T.; Jönsson, G.; Rha, S.Y.; Tsao, H. Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival. *J. Invest. Dermatol.* **2016**, *136*, 1002–1011, doi:10.1016/j.jid.2016.01.024.

21. BRCA1 and BRCA2 Gene Mutation Testing & Associated Cancers | Memorial Sloan Kettering Cancer Center Available online: <https://www.mskcc.org/cancer-care/risk-assessment-screening/genetic-counseling-and-testing/hereditary-cancer-genes-and-hereditary-cancer-syndromes/brca1-and-brca2-genes> (accessed on 4 March 2025).

22. BRCA and Melanoma | Bassett Center Available online: https://www.bassett.org/resources/brca-and-melanoma?utm_source=chatgpt.com (accessed on 4 March 2025).

23. Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> (accessed on 4 March 2025).

24. mm-admin Меланома: лікування, симптоми, діагностика, фото стадій - Дані 2024 року. *Profderm* 2023.

25. Types of melanoma Available online: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/melanoma/stages-types/types> (accessed on 4 March 2025).

26. Saginala, K.; Barsouk, A.; Aluru, J.S.; Rawla, P.; Barsouk, A. Epidemiology of Melanoma. *Med. Sci.* **2021**, *9*, 63,

doi:10.3390/medsci9040063.

27. Cancer Today Available online: <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed on 4 March 2025).

28. Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 229–263, doi:10.3322/caac.21834.

29. Gandini, S.; Sera, F.; Cattaruzza, M.S.; Pasquini, P.; Abeni, D.; Boyle, P.; Melchi, C.F. Meta-Analysis of Risk Factors for Cutaneous Melanoma: I. Common and Atypical Naevi. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 28–44, doi:10.1016/j.ejca.2004.10.015.

30. Chen, Y.; Yi, X.; Sun, N.; Guo, W.; Li, C. Epigenetics Regulates Antitumor Immunity in Melanoma. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 868786, doi:10.3389/fimmu.2022.868786.

31. Castellani, G.; Buccarelli, M.; Arasi, M.B.; Rossi, S.; Pisanu, M.E.; Bellenghi, M.; Lintas, C.; Tabolacci, C. BRAF Mutations in Melanoma: Biological Aspects, Therapeutic Implications, and Circulating Biomarkers. *Cancers* **2023**, *15*, 4026, doi:10.3390/cancers15164026.

32. Rabbie, R.; Ferguson, P.; Molina-Aguilar, C.; Adams, D.J.; Robles-Espinoza, C.D. Melanoma Subtypes: Genomic Profiles, Prognostic Molecular Markers and Therapeutic Possibilities. *J. Pathol.* **2019**, *247*, 539–551, doi:10.1002/path.5213.

33. Phadke, M.S.; Smalley, K.S.M. Targeting NRAS Mutations in Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2023**, *41*, 2661–2664, doi:10.1200/JCO.23.00205.

34. Randic, T.; Kozar, I.; Margue, C.; Utikal, J.; Kreis, S. NRAS Mutant Melanoma: Towards Better Therapies. *Cancer Treat. Rev.* **2021**, *99*, 102238, doi:10.1016/j.ctrv.2021.102238.

35. Larribère, L.; Utikal, J. NF1-Dependent Transcriptome Regulation in the Melanocyte Lineage and in Melanoma. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 3350,

doi:10.3390/jcm10153350.

36. Luo, L.; Shen, R.; Arora, A.; Orlow, I.; Busam, K.J.; Lezcano, C.; Lee, T.K.; Hernando, E.; Gorlov, I.; Amos, C.; et al. Landscape of Mutations in Early Stage Primary Cutaneous Melanoma: An InterMEL Study. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2022**, *35*, 605–612, doi:10.1111/pcmr.13058.

37. Truong, A.; Yoo, J.H.; Scherzer, M.T.; Sanchez, J.M.S.; Dale, K.J.; Kinsey, C.G.; Richards, J.R.; Shin, D.; Ghazi, P.C.; Onken, M.D.; et al. Chloroquine Sensitizes GNAQ/11-Mutated Melanoma to MEK1/2 Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 6374–6386, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1675.

38. Jin, S.-G.; Xiong, W.; Wu, X.; Yang, L.; Pfeifer, G.P. The DNA Methylation Landscape of Human Melanoma. *Genomics* **2015**, *106*, 322–330, doi:10.1016/j.ygeno.2015.09.004.

39. Micevic, G.; Theodosakis, N.; Bosenberg, M. Aberrant DNA Methylation in Melanoma: Biomarker and Therapeutic Opportunities. *Clin. Epigenetics* **2017**, *9*, 34, doi:10.1186/s13148-017-0332-8.

40. Giunta, E.F.; Arrichiello, G.; Curvietto, M.; Pappalardo, A.; Bosso, D.; Rosanova, M.; Diana, A.; Giordano, P.; Petrillo, A.; Federico, P.; et al. Epigenetic Regulation in Melanoma: Facts and Hopes. *Cells* **2021**, *10*, 2048, doi:10.3390/cells10082048.

41. Micevic, G.; Theodosakis, N.; Bosenberg, M. Aberrant DNA Methylation in Melanoma: Biomarker and Therapeutic Opportunities. *Clin. Epigenetics* **2017**, *9*, 34, doi:10.1186/s13148-017-0332-8.

42. Preston-Alp, S.; Jelinek, J.; Issa, J.-P.; Zaidi, M.R. Ultraviolet Radiation Modulates DNA Methylation in Melanocytes 2021, 2021.10.14.464470.

43. Akbani, R.; Akdemir, K.C.; Aksoy, B.A.; Albert, M.; Ally, A.; Amin, S.B.; Arachchi, H.; Arora, A.; Auman, J.T.; Ayala, B.; et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **2015**, *161*, 1681–1696, doi:10.1016/j.cell.2015.05.044.

44. Aleotti, V.; Catoni, C.; Poggiana, C.; Rosato, A.; Facchinetti, A.;

Scaini, M.C. Methylation Markers in Cutaneous Melanoma: Unravelling the Potential Utility of Their Tracking by Liquid Biopsy. *Cancers* **2021**, *13*, 6217, doi:10.3390/cancers13246217.

45. Guo, W.; Zhu, L.; Zhu, R.; Chen, Q.; Wang, Q.; Chen, J.-Q. A Four-DNA Methylation Biomarker Is a Superior Predictor of Survival of Patients with Cutaneous Melanoma. *eLife* **2019**, *8*, e44310, doi:10.7554/eLife.44310.

46. Wouters, J.; Vizoso, M.; Martinez-Cardus, A.; Carmona, F.J.; Govaere, O.; Laguna, T.; Joseph, J.; Dynoodt, P.; Aura, C.; Foth, M.; et al. Comprehensive DNA Methylation Study Identifies Novel Progression-Related and Prognostic Markers for Cutaneous Melanoma. *BMC Med.* **2017**, *15*, 101, doi:10.1186/s12916-017-0851-3.

47. Ratzinger, G.; Mitteregger, S.; Wolf, B.; Berger, R.; Zelger, B.; Weinlich, G.; Fritsch, P.; Goebel, G.; Fiegl, H. Association of TNFRSF10D DNA-Methylation with the Survival of Melanoma Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 11984–11995, doi:10.3390/ijms150711984.

48. Papaiz, D.D.; Rius, F.E.; Ayub, A.L.P.; Origassa, C.S.; Gujar, H.; Pessoa, D. de O.; Reis, E.M.; Nsengimana, J.; Newton-Bishop, J.; Mason, C.E.; et al. Genes Regulated by DNA Methylation Are Involved in Distinct Phenotypes during Melanoma Progression and Are Prognostic Factors for Patients. *Mol. Oncol.* **2022**, *16*, 1913–1930, doi:10.1002/1878-0261.13185.

49. Lin, Z.; Yang, L. Identification of a CpG-Based Signature Coupled with Gene Expression as Prognostic Indicators for Melanoma: A Preliminary Study. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 5302, doi:10.1038/s41598-023-50614-2.

50. Wilkinson, M.D.; Dumontier, M.; Aalbersberg, I.J.; Appleton, G.; Axton, M.; Baak, A.; Blomberg, N.; Boiten, J.-W.; da Silva Santos, L.B.; Bourne, P.E.; et al. The FAIR Guiding Principles for Scientific Data Management and Stewardship. *Sci. Data* **2016**, *3*, 160018, doi:10.1038/sdata.2016.18.

51. Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the

Council of 27 April 2016 on the Protection of Natural Persons with Regard to the Processing of Personal Data and on the Free Movement of Such Data, and Repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation) (Text with EEA Relevance); **2016**; Vol. 119;.

52. Hansen, K.D.; Timp, W.; Bravo, H.C.; Sabunciyan, S.; Langmead, B.; McDonald, O.G.; Wen, B.; Wu, H.; Liu, Y.; Diep, D.; et al. Increased Methylation Variation in Epigenetic Domains across Cancer Types. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 768–775, doi:10.1038/ng.865.

53. Phipson, B.; Oshlack, A. DiffVar: A New Method for Detecting Differential Variability with Application to Methylation in Cancer and Aging. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 465, doi:10.1186/s13059-014-0465-4.

54. Micevic, G.; Theodosakis, N.; Bosenberg, M. Aberrant DNA Methylation in Melanoma: Biomarker and Therapeutic Opportunities. *Clin. Epigenetics* **2017**, *9*, 34, doi:10.1186/s13148-017-0332-8.

55. Rubanov, A.; Berico, P.; Hernando, E. Epigenetic Mechanisms Underlying Melanoma Resistance to Immune and Targeted Therapies. *Cancers* **2022**, *14*, 5858, doi:10.3390/cancers14235858.

56. Kang, Z.; Wang, J.; Huang, W.; Liu, J.; Yan, W. Identification of Transcriptional Heterogeneity and Construction of a Prognostic Model for Melanoma Based on Single-Cell and Bulk Transcriptome Analysis. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 874429, doi:10.3389/fcell.2022.874429.

57. Robertson, A.G.; Shih, J.; Yau, C.; Gibb, E.A.; Oba, J.; Mungall, K.L.; Hess, J.M.; Uzunangelov, V.; Walter, V.; Danilova, L.; et al. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 204–220.e15, doi:10.1016/j.ccell.2017.07.003.

58. González-Ruiz, L.; González-Moles, M.Á.; González-Ruiz, I.; Ruiz-Ávila, I.; Ramos-García, P. Prognostic and Clinicopathological Significance of CCND1/Cyclin D1 Upregulation in Melanomas: A Systematic Review and Comprehensive Meta-Analysis. *Cancers* **2021**, *13*, 1314, doi:10.3390/cancers13061314.

59. Florent, L.; Saby, C.; Slimano, F.; Morjani, H. BRAF V600-Mutated Metastatic Melanoma and Targeted Therapy Resistance: An Update of the Current Knowledge. *Cancers* **2023**, *15*, 2607, doi:10.3390/cancers15092607.
60. Carreira, S.; Goodall, J.; Denat, L.; Rodriguez, M.; Nuciforo, P.; Hoek, K.S.; Testori, A.; Larue, L.; Goding, C.R. Mitf Regulation of D1 Controls Melanoma Proliferation and Invasiveness. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 3426–3439, doi:10.1101/gad.406406.

Додаток В

Таблиця В.1

Таблиця з характеристикою клінічних даних вибірки

		Пацієнти (N=462)	
Характеристика	Групи	№	%
Стать	Чоловіки	287	62.12%
	Жінки	175	37.88%
Вік	Медіана	58	
	Обсяг	15-89	
	≤ 58	229	49.57%
	>58	233	50.43%
Локалізація пухлини	Lymph nodes	208	45.02%
	Skin	148	32.03%
	Adrenal gland	2	0.43%
	Connective, subcutaneous and other soft tissues	71	15.37%
	Small intestine	8	1.73%
	Bronchus and lung	8	1.73%
	Brain	4	0.87%
	Vulva	1	0.22%
	Vagina	1	0.22%
	Parotid gland	1	0.22%
	Other and ill-defined sites	3	0.65%
	Liver and intrahepatic bile ducts	1	0.22%

	Colon	1	0.22%
	Nasal cavity and middle ear	1	0.22%
	Retroperitoneum and peritoneum	1	0.22%
	Spinal cord, cranial nerves, and other parts of central nervous system	1	0.22%
	Anus and anal canal	1	0.22%
	Breast	1	0.22%
Паталогічна стадія	0	7	1.52%
	I	78	16.88%
	II	140	30.30%
	III	169	36.58%
	IV	22	4.76%
	Невідомо	46	9.96%
Тип мутації	NRAS	116	25.11%
	BRAF	231	50.00%
	NF1	36	7.79%
	WT	79	17.10%
Виживання	Живі	240	51.95%
	Мертві	222	48.05%

Гіперметильовані та гіпометильовані гени - біомаркери при меланомі. Дані отримані з MDPI [44] та PMC [45].

	Символ гену	Повна назва гену	Вплив на меланому
Гіпер мети льова ні гени	<i>AURKB</i>	Aurora Kinase B	Дослідження in vitro показали, що пригнічення експресії або активності AURKB призводить до зниження росту клітин меланоми та індукції апоптозу.
	<i>APC</i>	Adenomatous Polyposis Coli	Зниження експресії збільшує потенціал проліферації клітин меланоми. Виявляється в метастазах меланоми в головному мозку.
	<i>CDH11</i>	Cadherin 11	Гіперметильований CDH11 сприяє розсіюванню пухлинних клітин, послаблюючи контакти між ними. Посилення проліферації після його інактивації може стимулювати подальше закріплення у вторинних ділянках, сприяючи прогресуванню меланоми.
	<i>CDH13</i>	Cadherin 13	Втрата CDH13 бере участь у розвитку злоякісної меланоми. Виявляється в метастазах меланоми в головному мозку.
	<i>CDKN2A</i>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	Гіперметильований промотор p16INK4A переважно спостерігається в NRAS-мутованих метастатичних

			меланомах.
	<i>CYBA</i>	Cytochrome b-245 alpha chain	Викликає міграцію клітин.
	<i>CLDN11</i>	Claudin 11	Його рівень метилування є потенційним інструментом для розрізнення злоякісної меланоми та невус-клітинного невусу.
	<i>DAPK</i>	Death-Associated Protein Kinase	Виявляється у пацієнтів як з шкірною, так і з увеальною меланомою: його епігенетичне приглушення є загальним механізмом утворення пухлини.
	<i>ESR1</i>	Estrogen Receptor 1	Виявлення метильованого ESR1 в тканинах або сироватках корелює з прогресуванням пухлини і, отже, має прогностичне значення у пацієнтів з меланомою.
	<i>FES</i>	Proto-Oncogene, Tyrosine Kinase	Втрата FES призводить до прогресування пухлини при BRAF V600E-індукованій меланомі мишей.
	<i>MAPK13</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 13	Його епігенетичне вимкнення сприяє прогресуванню меланоми: відновлення його експресії в клітинах меланоми за допомогою метилування промотора MAPK13 знижує проліферативну здатність цих клітин.
	<i>MEOX2</i>	Mesenchyme Homeobox 2	Ступінь метилування ДНК цього гена може передбачити прогноз пацієнтів з меланомою.

	<i>MGMT</i>	O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase	Його епігенетичне пригнічення було пов'язане з кращою відповіддю на терапію DTIC/TMZ і тривалішою PFS у пацієнтів з меланомою IV стадії та пацієнтів з меланомою III стадії
	<i>MITF</i>	Melanocyte Inducing Transcription Factor	Виявлено, що тіло гена MITF гіперметильоване в первинних пухлинах порівняно з метастазами.
	<i>OLIG3</i>	Oligodendrocyte Transcription Factor 3	Ступінь метилування ДНК цього гена може передбачити прогноз пацієнтів з меланомою.
	<i>OVOL1</i>	Ovo Like Transcriptional Repressor 1	Пацієнти з високою експресією OVOL1 в первинній пухлині мали значно кращий прогноз, ніж пацієнти з низькою експресією.
	<i>TRIM16</i>	Tripartite motif containing 16	Проліферація ↑, Міграція ↑
	<i>TSPY</i>	Testis-specific protein, Y-linked 1	Стимулює зростання пухлини.
	<i>WFDC1</i>	WAP four-disulfide core domain 1	Індукує розвиток і ріст пухлин
	<i>PD-L1</i>	Programmed Cell Death 1 Ligand 1	Зниження експресії PD-L1 корелює з меншою тривалістю виживаністю пацієнта.
	<i>PON3</i>	Paraoxonase 3	Його гіперметилування значно підвищене у пацієнтів з метастатичною меланомою.
	<i>PTEN</i>	Phosphatase And Tensin Homolog	Виявляється в метастазах меланоми в головному мозку.

	<i>RARβ2</i>	Retinoic Acid Receptor Beta 2	Його приглушення може бути ключовим епігенетичним фактором трансформації меланоцитів
	<i>RASSF6</i>	Ras association domain family member 6	Викликає збільшення пухлин, підсилює їх інвазивні властивості та ініціює вихід з судин.
	<i>RASSF8</i>	Ras association domain family member 8	Індукує проліферацію клітин, їх міграцію та інвазію в інші тканини.
	<i>RASSF1A</i>	Ras-Association Domain Family Member 1	Виявляється у пацієнтів з шкірною та увеальною меланомою. Може прогнозувати відповідь пацієнтів з IV стадією меланоми на біохіміотерапію.
	<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	Міграція клітин ↑, Інвазія ↑, Проліферація ↑, Ріст пухлини ↑
	<i>SYK</i>	Spleen associated tyrosine kinase	Ріст пухлини ↑, Інвазія ↑, Метастазування ↑
	<i>SOCS1/2</i>	Suppressor of Cytokine Signaling 1/2	Часто виявляється гіперметильованим у сироватці крові хворих на меланому або клітинних лініях меланоми.
Гіпометильовані гени	<i>DSS1</i>	Deleted in Split-Hand/Split-Foot 1	Його підвищена експресія асоціюється з наявністю метастазів, виразкуванням і зниженням виживуваності, що дозволяє використовувати його як біомаркер поганого прогнозу у пацієнтів з меланомою.
	<i>LINE-1</i>	Long Interspersed Nuclear Element-1	Підвищення рівня гіпометилування корелює з

			пізними стадіями та гіршим прогнозом.
	<i>MAGE-1/2/3/4</i>	Melanoma-Associated Antigen 1/2/3/4	Часто гіпометилується в клітинних лініях меланоми.
	<i>Maspin</i>	Maspin	Він поводить як ген-супресор пухлин при раку молочної залози та простати, але його роль при меланомі є суперечливою.
	<i>PDGFD, THRB, ZEB1</i>	Platelet-Derived Growth Factor D, Thyroid Hormone Receptor Beta, Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	Він може бути потенційним кандидатом для розробки ліків проти NRAS-мутантних меланом.
	<i>PD-L2</i>	Programmed Cell Death 1 Ligand 2	Предиктор більш тривалого життя з хворобою у пацієнтів
	<i>TBC1D16</i>	TBC1 Domain Family Member 16	Асоціюється з підвищеною клінічною відповіддю на інгібітори BRAF у пацієнтів з місенс-мутацією BRAF V600E.
	<i>TKTL1</i>	Transketolase Like 1	Він збільшує метастатичний потенціал клітин меланоми, сприяючи посиленню «ефекту Варбурга».