

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Матвеев Алексей Всеволодович

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Кононец Павел Вячеславович

Москва – 2024 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Прогностические сывороточные биомаркеры	12
1.2 Мутации отдельных генов в качестве прогностических и предикторных маркеров рака почки	14
1.3 Опухолевая мутационная нагрузка (ТМВ)	15
1.4 Гистологические прогностические биомаркеры	16
1.5 Предикторные биомаркеры	17
1.6 Сигнатуры экспрессии отобранных панелей генов как прогностические и предикторные биомаркеры	18
1.7 PD-L1 как прогностический и предикторный биомаркер	23
1.8 МикроРНК и рак почки	24
1.8.1 Экспрессия микроРНК в опухолевой и здоровой ткани почки.	25
1.8.2 МикроРНК как биомаркеры прогноза при раке почки.	26
1.8.3 МикроРНК как биомаркеры ответа на лечение	29
1.8.4 Метилирование ДНК и ее значение для онкогенеза	30
1.8.5 Роль метилирования генов микроРНК	31
1.8.6 Выбор белок-кодирующих генов и генов микроРНК для определения уровня экспрессии	32
Заключение	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	36
2.1 Общая характеристика материала	36
2.2 Характеристика клинического материала	37
2.3 Формирование выборки генов для исследования	38
2.4 Выделение высокомолекулярной ДНК	42
2.4.1 Выделение суммарной РНК. Проверка качества и измерение концентрации РНК	43
2.4.2 Проведение реакции обратной транскрипции	43

2.4.3 Полимеразная цепная реакция в реальном времени	44
2.5 Анализ экспрессии генов	44
2.6 Анализ метилирования генов микроРНК.....	45
2.7 Статистическая обработка данных	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
3.1 Анализ уровней экспрессии белок-кодирующих генов и уровня метилирования генов микроРНК с развитием метастазов скПКР.....	49
3.2 Составление панели маркеров метастазирования.....	51
3.3 Оценка прогностической значимости отобранных маркеров.....	54
3.4 Способ прогнозирования метастазирования скПКР	56
ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	63
ВЫВОДЫ	74
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	75
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	76
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	78

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования и степень ее разработанности

Рак почки представляет важную медицинскую проблему в связи со значительным ростом заболеваемости [10]. Наиболее распространенным и агрессивным среди гистологических типов рака этой локализации является светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР). Почти у половины пациентов со скПКР развиваются метастазы. Даже после радикально выполненного хирургического лечения раннего нематастатического светлоклеточного рака почки метастазы возникают в 5–15% случаев в течение пяти лет наблюдения, что существенно влияет на выживаемость пациентов [135]. Риск развития метастазов не всегда коррелирует с клиническими характеристиками опухоли. Информация о риске метастазирования нужна для определения необходимости проведения возможного адъювантного лечения, а также для планирования более или менее интенсивного наблюдения в послеоперационном периоде. Принимая во внимание активно внедряющиеся методы дооперационной биопсии небольших опухолевых образований в почке, выявление опухолей, склонных к метастазированию, может учитываться для выбора метода лечения и определении объема хирургического вмешательства. Наличие прогностических маркеров создаст возможность формировать группы для динамического наблюдения, применять терапевтические подходы для предотвращения метастазов, вовремя обнаруживать появляющиеся метастазы и эффективно лечить пациентов. В то же время используемые на практике молекулярные маркеры метастатического потенциала опухоли до сих пор отсутствуют.

Механизмы метастазирования до сих пор полностью не изучены. В настоящее время известны некоторые гены, ассоциированные с метастазированием скПКР, но возможность их использования в качестве маркеров не показана. Так, в образцах скПКР, полученных после нефрэктомии,

была показана роль экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (E-cadherin, clusterin, TWIST, vimentin) в качестве предикторов появления рецидива заболевания [78].

Регуляторные особенности гиперметилирования генов *VHL*, *RASSF1A*, *CDH1*, *APAF1* изучались многими исследователями в качестве биомаркеров светлоклеточного рака почки [60,28,194,130]. Показана большая частота спорадических мутаций в генах кодирующих белки, ассоциированные с модификацией гистонов и ре-моделированием хроматина, таких как *SETD2* (3–12%), *KDM5C* (3–8%), *KDM6A* (1%), *VAP1* (8–15%), и *PBRM1* (21–41%) [39]. Функции опухолевой супрессии и анти - метастатические функции были продемонстрированы для некоторых микроРНК, кодируемых 16 aberrantly метилируемыми генами (miR-124, miR-129, miR-132, miR-137, miR-148a, miR-203, miR-375, miR-9 и miR-34). [22,113,175]. Роль экспрессии miR-203 в метастазировании у больных скПКР подтверждена в ряде исследований [196].

Перспективным является изучение экспрессии и функциональных качеств микроРНК с одновременным изучением экспрессии белок-кодирующих генов, например, таких как *CA9*, *HIG2*, *EGLN3* и *NDUF4L2*. Активация данных генов осуществляется при участии транскрипционного фактора HIF1A, накопление которого наблюдается при мутации *VHL* или гипоксии и, следовательно, являются одним из начальных звеньев развития опухоли [169,72].

Процесс прогрессирования рака регулируется, одновременно, при участии белок-кодирующих генов и генов микроРНК, поэтому одновременное определение их экспрессии может быть использовано в качестве прогностических биомаркеров метастазирования рака почки. Идентификация таких маркеров может позволить индивидуализировать подходы к послеоперационному лечению, а также способствовать пониманию молекулярных путей для целевых терапевтических воздействий.

Цель исследования

Создание молекулярно-генетической панели для прогнозирования метастазирования светлоклеточного рака почки.

Задачи исследования

1. Исследовать особенности метилирования ряда генов микроРНК и экспрессии кодирующих белок генов при светлоклеточном раке почки.

2. Провести экспериментальный анализ кандидатов в маркеры на основе определения уровня экспрессии кодирующих белок генов и генов микроРНК в метастазирующих опухолях скПКР и в опухолях без метастазов.

3. Сформировать панели кодирующих белок генов и генов микроРНК для прогноза метастазирования скПКР.

4. Разработать способ прогнозирования метастазирования опухоли скПКР. Определить чувствительность и специфичность созданной панели.

Научная новизна

В результате выполнения диссертационной работы был проведен экспериментальный анализ кандидатов в маркеры кодирующих белки генов и генов микроРНК в метастазирующих опухолях скПКР и в опухолях без метастазов. Выявлен набор маркеров, позволяющих прогнозировать метастазирование рака почки с высокой степенью чувствительности, специфичности и достоверности. Предложен способ прогнозирования, позволяющий по результатам молекулярно-генетического анализа ткани опухоли выявлять опухоли, обладающие повышенным метастатическим потенциалом с точностью до 86,96 (ДИ 76,49-93,18) и специфичностью 97,56%. Проведена верификация предложенной панели на выборках парных образцов при одновременном анализе экспрессии и метилирования белок-кодирующих генов и

генов микроРНК. Характеристики панели: чувствительность 80%; специфичность 97,56%; точность 86,96 (ДИ 76,49–93,18). Следовательно, поставленные задачи выполнены полностью.

Технико-экономическая эффективность внедрения полученных результатов определяется повышением эффективности лечения рака почки, что будет приводить к снижению затрат на лечение и повышению длительности и качества жизни людей. Большинство результатов соответствуют мировому уровню.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в исследовании данные имеют важное практическое значение, поскольку на основании идентификации маркеров метастазирования скПЖР могут быть индивидуализированы современные подходы к адъювантному лечению больных светлоклеточным раком почки, определены алгоритмы наблюдения с целью выявления раннего рецидива заболевания, а также способствовать улучшению понимания молекулярных путей для целевых терапевтических воздействий.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа основывалась на изучении уровня экспрессии и метилирования генов-кандидатов в прогностические маркеры и формировании итоговой панели генов-маркеров. В выборку вошло 80 больных светлоклеточным почечно-клеточным раком почки, перенесших радикальную нефрэктомия). Выделение РНК и ДНК проводили общепринятыми методами. Экспрессию генов анализировали при помощи количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием специализированных наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США). Уровень метилирования анализируемых генов оценивали при помощи бисульфитной конверсии с последующей количественной метил-специфичной ПЦР. Статистическую

обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica 10.0.

Положения, выносимые на защиту

1. Изученный набор белок-кодирующих генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* характеризуются повышенной экспрессией у больных светлоклеточным раком почки. Гены микроРНК: *miR (1258, 34B/C, 107, 132, 125B-1, 137, 375, 193A, 203A)* характеризуются повышенным метилированием при светлоклеточном раке почки.

2. Снижение уровня экспрессии четырех исследуемых генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* связано с метастазированием опухоли. Маркером считается снижение уровня экспрессии ниже порогового значения, определенного ROC-анализом для каждого гена. Ассоциация метилирования генов микроРНК с метастазированием носила выборочный характер. Увеличение уровня метилирования 5 из 9 изученных генов *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* указывает на метастатический потенциал опухоли.

3. По характеристике $AUC > 0,7$ выделено девять белок-кодирующих и микроРНК кодирующих генов в качестве кандидатов в маркеры метастазирования скПКР. Различия значений медиан уровней экспрессии, метод логистической регрессии и ROC-анализ указывают на связь девяти изученных генов с метастазированием скПКР.

4. При практическом использовании панели маркеров из четырех БК генов (*CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*) считаем присутствие одновременно хотя бы трех маркеров положительным результатом. Маркером считается снижение уровня экспрессии ниже пограничного значения, определенного при ROC-анализе для каждого гена. В случае применения панели из пяти генов микроРНК (*miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*) считаем положительным результатом отклонение от порогового значения одновременно хотя бы четырех маркеров. В этом случае маркером считается повышение уровня метилирования

выше пограничного значения, определенного при ROC-анализе для каждого отдельного гена. Для панели из девяти генов можно считать положительным результатом одновременную выявление хотя бы шести маркеров. Наши данные продемонстрировали, что наилучшими показателями чувствительности (87%) и специфичности (96%) обладает комбинированная панель на основе одновременного измерения уровней экспрессии и уровней метилирования генов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют шифру научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, области науки 3. Медицинские науки, Группе научных специальностей 3.1. Клиническая медицина, Направлению исследований п.2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.).

Степень достоверности и апробация результатов

Репрезентативная выборка, обширный анализ литературных источников, использование методик, отвечающим мировым стандартам, отбор материала, подтвержденного гистологическим исследованием, использование современного статистического анализа свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции с участием отделения онкоурологии НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н. Н. Трапезникова, лаборатории молекулярно-генетической диагностики отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей, консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, «14» августа 2024 г, протокол №155/24.

Материалы диссертационного исследования доложены на XVII международном конгрессе российского общества онкоурологов (Санкт-Петербург, 29-30 сентября 2022 г.), конференции «Онкоурология» (Москва, 6-7 декабря 2022 г.), международном научном форуме “Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences” (Казахстан, Алма-Ата, 27-28 марта 2024 г.).

Публикации по теме диссертации

Материалы диссертационных исследований изложены в полном объеме в 7 публикациях, в том числе в 2 научных статьях в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 103 страницах и состоит из введения, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, который включает 211 источников. Работа иллюстрирована 6 рисунками и 9 таблицами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Идентификация надежных молекулярных биомаркеров для ранней диагностики, предсказания ближайшего и отдаленного прогноза, оценки эффективности терапии и мониторинга лечения является крайне важной и актуальной задачей в любом разделе онкологии. Больные с локализованными опухолями почки, как правило, не имеют симптомов, и новообразования почки выявляют случайно при обследовании по поводу другого заболевания. Тем не менее, у 25-35% пациентов со скПКР присутствуют симптомы, часто обусловленные уже наличием отдаленных метастазов [20]. Ранняя диагностика могла бы предотвратить прогрессирование болезни и достичь полного ответа большинство пациентов до перехода рака почки в метастатическую форму. Кроме того, возможность стратификации больных по риску прогрессирования после радикального хирургического лечения с помощью биомаркеров позволяет правильно отбирать пациентов для адъювантного лекарственного лечения с целью профилактики возникновения рецидивов и метастазирования. В настоящее время, многие молекулы рассматриваются как потенциальные прогностические маркеры рака почки. Однако, очень ограниченное число биомаркеров изучалось более чем в одном исследовании, что не позволяет рекомендовать их к использованию в рутинной клинической практике. В настоящее время классификация TNM остается одним из наиболее точных способов прогнозирования течения заболевания. Существующие прогностические модели при локализованном раке почки такие как UISS (University of California Los Angeles Integrated Staging System), SSIGN (клиническая стадия, размер опухоли, степень злокачественности и некроз), включает в себя как клинические, так и патологические параметры, однако точность этих номограмм не превышает 80 %, что незначительно превосходит только TNM классификацию. Точность номограммы Катана и прогностической модели Karakiewicz, используемых для прогноза выживаемости без прогрессирования после радикальной нефрэктомии также составляет около 80% [6].

У больных с метастатическим скПКР для прогнозирования выживаемости пациентов были разработаны и валидизированы различные прогностические модели. В клинической практике наиболее часто используется модель мемориального онкологического центра Слоана и Кеттеринга (MSKCC), которая была валидизирована Кливлендским Клиническим Фондом (CCF) [131,122], а также модель международного консорциума данных метастатического рака почки (IMDC), называемая также моделью Хенга [83,82]. Обе модели используют в качестве прогностических факторов число нейтрофилов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, скорректированного кальция, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), статус Карновского, время от постановки диагноза до начала системной терапии.

В то время как данные модели предоставляют важную общую информацию о прогнозе выживаемости, в последнее время начали активно изучаться биомаркеры, позволяющие прогнозировать более специфические показатели, такие как общая выживаемость (ОВ), беспрогрессивная выживаемость (БПВ), канцер-специфическая выживаемость (КСВ) и метастазирование. Дополнительно стали изучаться предиктивные биомаркеры, необходимые для прогнозирования выраженности ответа и продолжительности ответа на проводимое лечение.

1.1 Прогностические сывороточные биомаркеры

Использование сывороточных биомаркеров для диагностики, прогноза, мониторинга и выбора метода терапии представляет собой перспективное будущее персонализированной медицины. Сывороточные биомаркеры, такие как уровень скорректированного кальция, гемоглобина, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), нейтрофилов и тромбоцитов были проспективно валидизированы как прогностические биомаркеры БПВ и ОВ в моделях MSKCC [131], IMDC [83], International Kidney Cancer Working Group и других [117].

Еще одним из перспективных молекулярных серологических маркеров является карбонангидраза IX (CAIX). Этот фермент, который участвует в преобразовании углекислого газа в бикарбонат, транспорте ионов, контроле pH и

является маркером гипоксии опухоли. [167] В ряде исследований показано, что чем выше экспрессия этого белка при раке легких, молочной железы и опухолей головы и шеи, тем более агрессивна опухоль [31]. Напротив, у больных раком почки высокая экспрессия этого белка связана с лучшим прогнозом и ассоциирована с более ранними стадиями заболевания. Takasova et al. (2013), изучили образцы крови и ткани опухоли у 74 пациентов с опухолями почки. Образцы крови анализировались на наличие CAIX mRNA или на наличие сывороточного CAIX протеина. У 50% больных отмечена высокая экспрессия CAIX в периферической крови при опухолях T1 и только у 25% при опухолях T3. Специфичность CAIX по данным авторов составила 100%, так как у больных доброкачественными опухолями и здоровых доноров экспрессия не выявлена ни в одном случае [168]. Таким образом, повышенный уровень экспрессии CAIX был ассоциирован с лучшими показателями БПВ и ОВ. Напротив, повышение кооперированного соотношения тромбоцитов и нейтрофилов к лимфоцитам (COP-NLR) [118], уровня С-реактивного белка (СРБ) [25], сывороточного опухолево-ассоциированного ингибитора трипсина (s-TATI) [172] и сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) [63] являются прогностически неблагоприятными факторами в отношении выживаемости. Показаны противоречивые или неубедительные данные о роли активатора протеина Ras p21 [42](не нашел про рас 21 в статье), растворимого рецептора сосудисто-эндотелиального фактора роста (sVEGF-r) [141], тканевого ингибитора матричной металлопротеазы-1 (TIMP-1 mRNA) [141,57]. Так, например, повышенная экспрессия TIMP-1 в сыворотке была положительно ассоциирована с наличием метастазов и ОВ в одном исследовании [141] и негативно ассоциирована с ОВ в другом исследовании [57]. Все вышеуказанные белки плазмы (VEGF, VEGFR-2, CAIX, TIMP-1, Ras p21) продемонстрировали свое прогностическое значение для выживаемости в крупном проспективном исследовании сорафениба у больных раком почки, однако только TIMP-1 показал свое независимое прогностическое значение в многофакторном анализе [141].

1.2 Мутации отдельных генов в качестве прогностических и предикторных маркеров рака почки

Кроме сывороточных биомаркеров рака почки, большой интерес представляют мутации отдельных генов в опухоли, которые могут выступать как прогностические факторы выживаемости и предикторы ответа на системную терапию. Потеря гетерозиготности между сегментами 3p25 и 3p21 короткого плеча 3 хромосомы отмечается более чем в 90% случаев светлоклеточного рака почки и является первым практически универсальным событием в патогенезе светлоклеточного рака почки [163,129]. Наиболее частыми мутациями второго аллеля генов, находящихся в этой локации являются мутации гена-супрессора опухоли (*VHL*), далее по убыванию мутации генов полибромо-1 (*PBRM1*), BRCA-1 ассоциированного белка -1 (*BAP-1*) и гена *SETD2* [54]. В то время как ген *VHL* подвержен как мутации, так и метилированию, другие гены в большинстве случаев подвержены только мутации. *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1* относятся к генам, модулирующим хроматин и могут быть мутированы не только при светлоклеточном раке почки, в отличие от гена *VHL*. Мутация второго аллеля гена *VHL* или метилирование промотера приводит к инактивации белка *VHL*, нарушению регуляции факторов $HIF1\alpha$ и $HIF2\alpha$, что приводит к накоплению транскрипционного фактора *HIF* в клетке и транскрипции различных факторов роста, связанных с ангиогенезом, пролиферацией, выживанием опухолевой клетки и метастазированием. Несмотря на значение драйверной мутации *VHL* в патогенезе рака почки, наличие альтерации *VHL* достоверно не влияет на БПВ и ответ на антиангиогенную терапию, а также на другие показатели выживаемости [92].

Роль мутации гена опухолевой супрессии *PBRM1* предикторного и/или прогностического маркера оказалась вариабельной в различных работах. Дополнительно мутации с потерей функции *PBRM-1* ассоциированы с менее иммуногенным и более ангиогенным опухолевым микроокружением, что может предвещать худший прогноз [111] и плохой ответ на терапию ингибиторами

контрольных точек (ИКТ). Прогностическое значение мутаций *PBRM1*, как маркера выживаемости, может зависеть от вида получаемой системной терапии. Мутации в генах *VAP1* (12%) и *PBRM1* (34%) практически не наблюдаются одновременно при светлоклеточном раке почки. Одновременные мутации в генах *VAP1* и *PBRM1* клетки могут подвергаться негативной селекции [142]. Среди опухолей с мутациями в гене *VAP1* более часто встречаются метастатические и имеется тенденция к худшей выживаемости по сравнению с больными с опухолями с мутациями в гене *PBRM1* [74,150].

Частота альтераций *SETD2* в базе данных атласа ракового генома (TCGA) [150] составляет 13% при локализованных опухолях и 30% при метастатических опухолях. Опухоли с мутациями *SETD2* ассоциированы с худшим прогнозом и с высокими стадиями рака почки [75]. Прогностически у 421 больных из когорты TCGA с наличием *SETD2* мутации отмечалась худшая выживаемость [74]. При анализе данных из исследований COMPARZ и RECORD-3 у больных с метастатическим раком почки не было отмечено корреляции между мутациями в гене *SETD2* и выживаемостью [179].

Спорные или неубедительные данные существуют в отношении мутации аллелей в генах эндогенного ретровируса (*ERV*) [32], мишени рапамицина млекопитающих (*mTOR*) [133] в отношении их влияния на выживаемость. Неблагоприятными факторами ОБ и БПВ могут являться мутации генов *CDKN2A*, *SIMP* /FH, и *TERT* [109,41] по сравнению с пациентами с диким типом аллель этих генов.

1.3 Опухолевая мутационная нагрузка (ТМВ)

Ряд исследований демонстрирует корреляцию выживаемости с опухолевой мутационной нагрузкой (ТМВ), что, однако не подтверждается другими работами [98,188]. Мутационная нагрузка (Tumor Mutational Burden, ТМВ) — это количественная мера общего числа соматических несинонимичных мутаций на

кодирующий участок опухолевого генома, которая показывает количество мутаций на миллион оснований (mut/Mb).

ТМВ косвенно отражает объем неоантигенов в опухоли и служит предиктором ответа на лечение ИКТ у больных с уротелиальным раком, меланомой и раком легкого [98]. К сожалению, при раке почки данной взаимосвязи не прослеживается. Так, в исследовании включившем анализ более 1600 образцов солидных опухолей с использованием диагностической панели MSK-IMPACT в когорте из 151 больного раком почки не было выявлено ассоциации между ОВ, ответом на иммуно-терапевтические режимы и ТМВ [154,49]. Отсутствие корреляции между ответом на иммуноонкологические (ИО) препараты и ТМВ было показано в серии ретроспективных работ [188,59]. При использовании образцов опухоли, полученных из клинических исследований CheckMate-025, CheckMate-010, CheckMate-009, сравнивающих ниволумаб с эверолимусом у больных метастатическим раком почки не было получено корреляции между ответом на терапию и ТМВ при анализе результатов лечения 261 больного, получавших ниволумаб [124,56]. Анализ двух недавних крупных исследований CheckMate-214 и JAVELIN Renal-101, изучавших современные иммунологические комбинации по сравнению с сунитинибом не показал различий в ответе на лечение у больных с высокой и низкой ТМВ [132,133]. Недавно одобренное показание к назначению ингибитора PD-1, пембролизумабу, для пациентов с высокой ТМВ (≥ 10 mut/Mb), прогрессирующих на стандартной терапии, видимо, не должно распространяться на метастатический рак почки, учитывая отсутствие ассоциации ответа и ТМВ.

1.4 Гистологические прогностические биомаркеры

Иммуногистохимические биомаркеры могут также иметь прогностическое значение у больных раком почки. Высокие уровни экспрессии CAIX показали связь с улучшением безрецидивной выживаемости [42]. Соответственно в другом исследовании низкие уровни CAIX были ассоциированы с ухудшением канцер-

специфической выживаемости (КСВ) [38]. Учитывая сложную взаимосвязь между Т-клетками и опухолевыми клетками рака почки, инфильтрация различных областей опухоли CD8+ Т-клетками также может играть прогностическое значение.

Так, наличие высокой плотности CD8+ Т- лимфоцитами в центре опухоли или инвазия границ опухоли были ассоциированы с улучшением БПВ у пациентов, получавших сунитиниб, в то время как для пациентов, получавших авелумаб с акситинибом, степень инфильтрации CD8+ Т-клетками не влияла на прогноз [133]. С другой стороны, инфильтрация макрофагами была ассоциирована с худшей ОВ и БПВ у пациентов, получавших антиангиогенные тирозинкиназные ингибиторы, хотя очень ограниченное число работ изучали значение инфильтрации макрофагами у пациентов, получающих другие варианты противоопухолевой терапии [76].

1.5 Предикторные биомаркеры

Число биомаркеров, которые могут рассматриваться, как предикторы общего ответа на системную терапию и предсказания времени до прогрессирования очень ограничено. Низкий гемоглобин и повышенное число нейтрофилов ассоциировано с уменьшением времени до прогрессирования на фоне цитокиновой терапии [136]. С появлением таргетной терапии несколько исследований показали, что повышенный С-реактивный белок и мутации гена MET ассоциированы с лучшим ответом на антиангиогенную терапию [25,51]. Мутации гена *PBRM-1* и отсутствие мутации *VAP1* коррелируют с лучшим ответом на анти-VEGF таргетную терапию [41]. В ряде работ мутации с потерей функции *PBRM-1* были ассоциированы с увеличением общего ответа у пациентов, получающих монотерапию ниволумабом [124,33,111,32], однако, не влияли на эти показатели у пациентов, получавших эверолимус, сунитиниб или комбинированную терапию [33,132,133,111]. Тем не менее, данные о роли мутаций *PBRM-1* как предикторного биомаркера довольно противоречивы. В

других публикациях отмечено уменьшение частоты ответов у пациентов, получавших атезолизумаб [120] и увеличение времени до прогрессирования у больных получавших анти-VEGF таргетную терапию [33].

Мутации в генах, связанные с сигнальным путем *mTOR* (*TSC1*, *TSC2*, *MTOR*) и экспрессия *PTEN* были ассоциированы в ряде работ с более высоким ответом при использовании ингибиторов *mTOR*, чем в случаях без мутаций [97,178,152].

С появлением в клинической практике ингибиторов контрольных точек иммунного ответа, мутации промотера *TERT*, изучались как предикторы резистентности к терапии с использованием иммуно-онкологических препаратов. В исследовании Dizman et al. (2020) в когорте пациентов с мутацией промотера *TERT* не наблюдалось эффекта от терапии иммуно-онкологическими препаратами [59].

В других исследованиях было показано, что наличие экспрессии человеческого эндогенного ретровируса (*hERV*) было ассоциировано с улучшением ответа на лечение ингибиторами контрольных точек и ниволумаб [139,144].

Таким образом, уровень СРБ и мутации в генах *MET*, *PBRM-1* и *BAP1* ассоциированы с ответом на лечение ИТК, а мутации в генах сигнального пути *mTOR* и экспрессия *PTEN* может быть ассоциирована с ответом на ингибиторы *mTOR*. Мутации промотера *TERT*, экспрессия *hERV*, и экспрессия Т-эффекторов может быть ассоциирована с лучшим ответом на лечение ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

1.6 Сигнатуры экспрессии отобранных панелей генов как прогностические и предикторные биомаркеры

Изучение сигнатуры экспрессии отдельных генов и сигнатур нескольких генов (GES) в качестве прогностических и предикторных биомаркеров активно исследуется [148].

Определение уровня экспрессии РНК является хорошим потенциальным биомаркером. Изменения в паттернах экспрессии генов напрямую коррелируют с биологическими изменениями в клетке и могут отражать фенотипические характеристики опухолевой клетки разных нозологий. Использование современного подхода, основанного на секвенировании, позволяет определять транскрипционный профиль опухолевых клеток, выявить варианты сплайсинга, слияния генов и другие изменения, которые не детектируются при анализе ДНК [187].

Впервые, классификация ПКР, основанная на определении уровня экспрессии панели из 110 генов и анализа выживаемости была предложена в 2010 году для молекулярно-генетической стратификации рака почки, позволяющей прогнозировать агрессивность опухоли, ее способность к метастазированию и выживаемость пациентов [30,157]. Авторы предложили включить в классификацию светлоклеточного рака почки выделенный ими тип А (ccA) и тип В (ccB) для характеристики агрессивности и метастазирования [30]. При сроке наблюдения 5 лет, выживаемость для пациентов в когорте ccA составила 48% и только 23% для пациентов в когорте ccB. На основании ccA/ccB кластеров, была создана сигнатура экспрессии 34 генов (ClearCode34) как прогностический биомаркер, который может надежно оценивать вероятность рецидива заболевания. Данная сигнатура позволяет выделять пациентов, которые нуждаются в адъювантной терапии после хирургического лечения, или могут просто быть оставлены под наблюдением [34]. Сигнатура экспрессии генов может также быть использована для дифференциальной диагностики опухолевой и здоровой ткани почки. Таким образом, выделение специфичных для драйверных мутаций сигнатур экспрессии генов представляет собой логичную стратегию для выявления ранних онкогенных изменений в неопластических клетках, уточнения диагноза полученного на основе биопсии и выбора тактики лечения [174,18]. Ujfaludi et al. (2022) проанализировал транскриптомную сигнатуру ключевых драйверных генов для светлоклеточного рака почки - *VHL*, *SETD2*, *PBRM1*, и *BAP1*, показав, что медиана уровня транскрипции этих генов отличается в

опухоли и нормальной ткани со средним уровнем чувствительности и специфичности (87% и 77% соответственно) [174].

Характеристики метастатического рака почки включают аномально повышенную активность VEGF ассоциированных сигнальных путей, стимулирующих ангиогенез, необходимый для роста опухоли. С другой стороны, экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и инфильтрирующих опухоль клетках угнетает иммунный противоопухолевый ответ. Несколько сигнатур экспрессии генов, отображающих ангиогенные и иммуногенные сигнальные пути изучались в качестве прогностических и предикторных факторов у больных метастатическим раком почки с использованием больших баз данных пациентов, получавших лечение в рамках крупных рандомизированных исследований.

Так в 2019 году McDermott *et al* (2018) выделил 3 сигнатуры генов при анализе исследования IMmotion 150, включающие панель связанную с ангиогенезом (“IMmotion 150 Angio”) и оценивающую экспрессию VEGFA, KDR, ESM1, PECAM1, ANGPTL4 и CD34; панель связанную с миелоидным воспалением (“IMmotion 150 Myeloid”), оценивающую экспрессию *IL-6*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, и *PTGS2*, и панель оценивающую активацию иммунных реакций, включая наличие и функцию эффекторных Т-клеток, реакцию IFN- γ , ингибиторов контрольных точек и презентацию антигена (“IMmotion 150 Teff”), оценивающую экспрессию CD8A, EOMES, PRF1, IFNG, и CD274 [120].

Аналогично Motzer *et al.* (2020) выделил 2 сигнатуры экспрессии генов при анализе исследования JAVELIN Renal 101, анализирующих экспрессию 26 генов в каждой панели, “Renal 101 Immuno” и “Renal 101 Angio”. Ассоциацию уровня экспрессии этих панелей генов с показателями ОБ, БПВ и частотой ответа проанализировали на когортах больных из исследований IMmotion 150 и 151, JAVELIN RENAL 100 и 101, и CheckMate 214 [133].

Панели, оценивающие ангиогенез по сигнатурам экспрессии генов IMmotion 150 Angio и JAVELIN Renal 101 Angio продемонстрировали улучшение БПВ и частоты ответов у пациентов с высокой экспрессией, получавших сунитиниб [132,120,151]. Однако пациенты, получающие комбинацию

ниволумаба и ипилимумаба, с высокой экспрессией IMmotion 150 Angio обладали более низкой частотой ответа на лечение [141], а пациенты с низкой экспрессией IMmotion 150 Angio получающие комбинацию атезолизумаб + бевацизумаб или сунитиниб продемонстрировали ухудшение БПВ [120]. Более того, высокая экспрессия IMmotion 150 Angio была ассоциирована с пациентами с низким риском прогрессирования, по сравнению с промежуточным и высоким риском [151]. Таким образом, несмотря на то, что вышеупомянутые ангиогенные сигнатуры могут являться предикторами хорошего ответа на таргетную антиангиогенную терапию по сравнению с ингибиторами контрольных точек или комбинированной терапии, их практическое применение вызывает сомнение, так как стандартом терапии первой линии метастатического рака почки является именно комбинированная терапия ТКИ и ИКТ иммунного ответа.

В то время как большинство прогностических и предикторных GES требуют дальнейшей валидации, существует консенсус для ангиогенных GES (IMmotion 150 Angio, JAVELIN Renal 101 Angio) как предикторных биомаркеров ответа на сунитиниб и для иммуногенных GES (IMmotion 150 Teff, JAVELIN Renal 101 Immuno) как биомаркеров-предикторов лучшего ответа на терапию ИКТ. Дополнительно, GES миелоидного воспаления (IMmotion Teff, Myeloid) может являться предиктором ответа на комбинированную терапию ТКИ + ИКТ по сравнению с монотерапией ИКТ.

Анализ биомаркеров у больных метастатическим раком почки, включенных в исследование CheckMate 214 показал, что комбинированные сигнатуры экспрессии генов, такие как воспалительная с ангиогенной или миелоидной могут быть предикторами лучшего ответа на иммунотерапию по сравнению с монотерапией мультикиназными ингибиторами [132].

Экспрессия фактора транскрипции *DUX4* и сигнатур 6 генов (*ZSCAN4*, *PRAMEF1*, *TRIM51*, *KHDC1L*, *MBD3L2*, *TRIM43*) не показала своего прогностического значения при анализе исследования Javelin renal 101 [133].

В исследовании Brown et al. (2022) высокая экспрессия панели 5 генов (*FOXP3*, *CCR4*, *KLRK1*, *ITK*, *TIGIT*) была ассоциирована с улучшением ответа на

терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ниволумаб), но не коррелировала с показателями БПВ и ОВ у больных получавших ипилимумаб и новолумаб [36]

Апанович Н.В. и соавт. (2018) была продемонстрирована корреляция экспрессии генов и преобладающей активности генов, связанных с сигнальным путем Ras–RAF–ERK у пациентов без признаков прогрессирования в течение 3,5 лет наблюдения, и преобладание активности генов, связанных с PI3K–АКТ–mTOR у пациентов, умерших от прогрессирования в этот срок. Уровень экспрессии гена *VEGFA* у больных скПКР, по мнению авторов, является перспективным биомаркером в отношении общей выживаемости [13].

В нашем раннем исследовании были изучены профили экспрессии генов, отобранные биоинформационным путем на парных образцах опухоль-контроль при скПКР [2]. На основании анализа полученных профилей экспрессии были определены гены, дифференциально экспрессирующиеся в образцах светлоклеточного рака почки и здоровой ткани и была продемонстрирована статистически достоверная корреляция экспрессии этих генов с прогрессией заболевания и дифференцировкой опухоли. Экспрессия *CA9*, *NDUFA4L2*, *VWF*, *BHLHE41*, *EGLN3* и *VEGFA* была ассоциирована с выживаемостью. Чувствительность и специфичность потенциальных маркеров прогноза 3,5-летней выживаемости, при оценке по отдельным генам, находилась в интервалах 70-91% и 71-93%, соответственно. Интересным является тот факт, что уровень экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *VWF*, *IGFBP3*, *ANGPTL4* и *BHLHE41* был высоким на ранних стадиях светлоклеточного почечно-клеточного рака и снижался при его прогрессии. Нами также было показано, что уровень экспрессии генов *ANGPTL4*, *BHLHE41*, *IGFBP3* был связан со степенью дифференцировки клеток опухоли. Снижение уровня их экспрессии было ассоциировано со снижением степени дифференцировки клеток скПКР [2]. В другой публикации Апанович и соавт. (2021) было показано прогностическое значение панели из 4 генов *CA9*, *EGLN3*, *BHLHE41*, *VWF* в отношении прогнозирования общей выживаемости больных скПКР с вероятностью продолжительности жизни больше

3,5 лет более 90%, а также значение координированной экспрессии генов *EGLN3* and *NDUFA4L2* в регуляции гликолиза и митохондриального метаболизма [11].

Прогнозирование метастазирования является актуальной задачей в связи с появлением в клинической практике эффективных режимов адъювантной терапии у больных со светлоклеточным раком почки. (Апанович и соавт. (2021)). В этой связи сделанное недавно предположение о том, что развитие синхронных метастазов при светлоклеточном почечно-клеточном раке ассоциировано с уровнем экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE4*, *EGLN3*, *C1QA* представляется особенно актуальным.

Большинство исследованных сигнатур экспрессии генов не вошли до сих пор в клиническую практику из-за отсутствия надежной воспроизводимости результатов. Для преодоления этих несоответствий результатов Геномный Атлас рака (TCGA) компилирует наборы данных, которые используются для валидации новых панелей и сигнатур. Еще одним спорным вопросом в анализе генных сигнатур является их способ оценки. Подход «вниз верхушкой» стремится установить ассоциации между клиническими результатами, такими как метастазирование и выживаемость, с профилем экспрессии. И наоборот, подход «вверх дном» стремится связать биологический базис экспрессии генов с факторами, ассоциированными с прогрессией опухоли [11]. Предиктивное значение сигнатур неизбежно связано с применяемыми лекарственными препаратами, в связи с чем число таких сигнатур значительно меньше, чем прогностических. Дополнительно, профили экспрессии могут отражать изменения соответствующих белков, которые в будущем могут стать терапевтическими мишенями для новых таргетных препаратов.

1.7 PD-L1 как прогностический и предикторный биомаркер

Экспрессия PD-L1 на клетках рака почки является одной из главных биологических мишеней для ИКТ иммунного ответа и, соответственно, привлекает внимание как потенциальный прогностический и предикторный

биомаркер. Результаты мета-анализа, опубликованного в 2020 году, в отношении прогноза заболевания показали, что экспрессия PD-L1 была положительно связана с ОБ (HR = 1.98, 95%CI: 1.22-3.22) и БПВ (HR = 3.70, 95%CI: 2.07-6.62) [159]. Эти данные интересны, так как ранее было показано, что опухоли с экспрессией PD-L1 имеют более агрессивное течение [50,171]. Улучшение показателей выживаемости у пациентов с положительной экспрессией PD-L1 связано с тем, что именно эти опухоли лучше отвечают на иммунотерапию ИКТ. На сегодняшний день PD-L1 считается прогностическим биомаркером ОБ и БПВ. Однако экспрессия PD-L1 меняется в течение заболевания, и может отличаться в первичной опухоли и метастазах, что затрудняет точность определения этого биомаркера и его клиническую значимость.

1.8 МикроРНК и рак почки

МикроРНК относятся к семейству коротких (20-24 нуклеотидов) некодирующих белок РНК, являющихся крайне консервативными и устойчивыми генетическими структурами, регулирующими посттранскрипционную экспрессию генов. Их использование в качестве биомаркеров, характеризующих процессы метастазирования, инвазии, ангиогенеза, апоптоза, пролиферации, дифференцировки, ЭМП, метаболизма и устойчивости опухоли к лекарственному лечению приобретает все большее значение по мере увеличения наших знаний в этой области [55]. МикроРНК могут функционировать и как стимуляторы функции онкогенов и как опухолевые супрессоры [198].

Значение микроРНК при раке почки до конца не изучено. Известно, что при раке почки, они вовлечены в регулирование ключевых сигнальных путей, зависящих от гипоксии и функционирования гена VHL, таких как VEGF, PI3K/АКТ/mTOR, TGF- β /NF- κ B и других сигнальных путей связанных с метаболизмом и иммунным ответом [198].

Различные уровни экспрессии микроРНК в опухолевой и здоровой ткани почки позволяют отличить здоровую ткань от опухолевой и дифференцировать

различные варианты ПКР между собой [95]. Выделение и анализ микроРНК из биологических жидкостей является интересным научным и практическим направлением. Циркулирующие в крови микроРНК являются перспективными диагностическими биомаркерами ПКР [193]. Сведения о наличии микроРНК в моче у больных раком почки на сегодняшний день носят ограниченный характер.

Использование микроРНК для диагностики рецидива опухолевого процесса представляется перспективным направлением исследований в области молекулярной онкологии. В частности, уровень экспрессии некоторых микроРНК коррелирует с прогнозом у больных ПКР. Сравнение уровней экспрессии микроРНК между первичной опухолью и метастазами может помочь в идентификации опухолей с высоким риском прогрессии [58]. Кроме того, в ряде исследований предлагается осуществлять мониторинг больных, получающих лекарственную терапию, по определению уровня экспрессии микроРНК в опухоли и сыворотке крови, что позволяет отличить пациентов с хорошим ответом от больных резистентных к лечению [85,94,149].

1.8.1 Экспрессия микроРНК в опухолевой и здоровой ткани почки

Гены микроРНК имеют разный уровень экспрессии в здоровой и опухолевой ткани. Nakada et al., используя диагностическую панель из 470 микроРНК, выделил 43 микроРНК, имеющих различную экспрессию в образцах светлоклеточного рака почки и нормальной ткани, а также 57 микроРНК, которые дифференциально экспрессировались в образцах хромофобного рака почки и нормальной ткани. MiR-141 и miR-200 имели низкий уровень экспрессии при скПКР [134].

В другом исследовании при анализе парных образцов (опухоль/норма) рака почки с использованием панели генов, состоящей из 847 микроРНК, было показано, что для 38 микроРНК наблюдалась гиперэкспрессия и 48 продемонстрировали низкий уровень экспрессии. [200]

Juan et al. [87] обнаружил 26 микроРНК с пониженной экспрессией и 9 с повышенной, включая miR-21, miR-210 miR-155.

Chow et al. идентифицировал 80 дифференциально экспрессирующихся в здоровой и опухолевой ткани микроРНК у больных светлоклеточным раком почки. Из них 33 были отнесены автором к группе с высоким риском («высокой» сигнальной группе). MiR-122, miR-200c имели наибольшую степень дисрегуляции [52].

В исследовании Cheng et al. 8 микроРНК были отобраны авторами работы для анализа в ткани и сыворотке крови. miR-34a, miR-21 и miR-224 имели высокую экспрессию тканях скПКР, но низкую в сыворотке ($p < 0.01$), в то время как miR-141, miR-149 miR-429 имели значительно более низкий уровень экспрессии в тканях скПКР ($p < 0,01$) [47]. miR-129-3p была предложена авторами как перспективный диагностический биомаркер дифференцирующий скПКР от здоровой ткани с точностью 73.5% [45].

Таким образом, несмотря на различные результаты, полученные в разных исследованиях, существует несколько дисрегуляторных микроРНК, упоминающихся во всех публикациях. Так группа микроРНК с высокой регуляцией в опухолевой ткани светлоклеточного рака почки включает miR-210, miR-21, miR-155, miR-122 и miR-224. Группа микроРНК с низкой регуляцией включает miR-141, miR-200cb, miR-138, miR-429, miR-204, miR-363, miR-200a, miR-21 и miR-532.

1.8.2 МикроРНК как биомаркеры прогноза при раке почки

МикроРНК могут использоваться как потенциальные биомаркеры при разных злокачественных опухолях. При раке почки низкие уровни miR-129-3p были ассоциированы с короткой безрецидивной выживаемостью и общей выживаемостью [45].

Парный анализ микроРНК и оценка экспрессии мРНК - могут помочь идентифицировать опухолево-специфичные микроРНК при разных подтипах

светлоклеточного рака почки. В работе Nao et al (2014) 5 потенциальных биомаркеров включали miR-425, miR-136, miR-340, miR-335 и miR-320d [77].

Считается, что некоторые микроРНК могут быть ассоциированы с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Так, высокая экспрессия miR-210 в публикации McCormick et al (2013) была ассоциирована с более низкой стадией и степенью дифференцировки опухоли [119]. Напротив, Samaan et al (2015) указывает на более низкую общую выживаемость и более высокий риск рецидива заболевания у пациентов с гиперэкспрессией miR-210, что однако не было подтверждено после стратификации пациентов по размеру опухоли и стадии TNM [153].

В исследовании Zaman MS, включавшем 54 пациента, была показана достоверная корреляция между уровнем экспрессии miR-21 и выживаемостью больных раком почки: все пациенты с низкой экспрессией (10%) miR-21 пережили 5-летний срок, по сравнению только с 50% пациентов с высокой экспрессией. Высокая экспрессия miR-21 была ассоциирована с более высокой стадией заболевания [202]. Подтверждением этих результатов является другая работа, показавшая худшую БРВ и ОВ у пациентов с высокой экспрессией miR-21 у 121 пациента с различными гистологическими вариантами рака почки. Наиболее высокие показатели экспрессии отмечены у больных со светлоклеточным и папиллярным раком почки [64]. В работе Vergho et al (2014) была продемонстрирована достоверная корреляция повышенной экспрессии miR-21 и пониженной экспрессии miR-126 с метастазами и КСВ [176]. Высокая экспрессия miR-100 в опухолевой ткани была показана как независимый неблагоприятный прогностический фактор ОВ и КСВ [181].

У больных с III и IV стадией светлоклеточного рака почки низкая экспрессия miR-155 коррелировала с плохим прогнозом [162]. miR-106b значительно гиперэкспрессирована при скПРК, однако ее экспрессия существенно ниже в опухолях с развившимися метастазами, поэтому miR-106b может рассматриваться как потенциальный предиктивный маркер раннего развития метастазов после нефрэктомии [164].

Из 33 микроРНК, дискриминирующих метастатические и неметастатические опухоли, miR-451, miR-221, miR-30a, miR-10b и miR-29a продемонстрировали наиболее выраженное снижение экспрессии. Дополнительно, группа из 4 микроРНК (let-7a, let-7c, miR-26a, miR-30c) позволяла дифференцировать пациентов с разным течением болезни (первично метастатические опухоли, метакронные метастазы и неметастатические опухоли). Низкая экспрессия miR-26a, miR-10a, miR-143, miR-19b и let-7c продемонстрировала достоверную корреляцию с низкой БПВ и КСВ [80].

Исследование, сравнивающее первично метастатические случаи скПКР и неметастатические опухоли, продемонстрировало 14 различно экспрессированных микроРНК. Пониженная экспрессия miR-30c и повышенная miR-126 и miR-451 показала достоверную корреляцию с БПВ и КСВ [81]. Osanto et al (2012) выделил 12 микроРНК позволяющих дискриминировать метастатические опухоли и опухоли, без метастазов [138]. 4 микроРНК были выбраны для построения метастатической сигнатуры опухоли: пониженная экспрессия miR-10b, miR-139-5p, и повышенная экспрессия miR-130b и miR-199b-5p. Сигнатура имела чувствительность 76% и специфичность 100% [191].

Другое исследование, анализирующее 20 парных образцов ткани метастазов скПКР и соответствующих первичных опухолей, показало, что наибольшие различия в экспрессии отмечены у микроРНК miR-10b, miR-126, miR-196a, miR-204, miR-215, miR-192 и miR-194 [91]. Дальнейшие исследования miR-215, miR-192 и miR-215 этих же авторов обнаружили конвергирующий эффект (одна и та же мишень в геноме может взаимодействовать с несколькими микроРНК) и разнонаправленный эффект (одна микроРНК может контролировать несколько мишеней). Низкая экспрессия miR-215 была ассоциирована со значительно худшей БРВ [90].

Для диагностики раннего рецидива после нефрэктомии было предложено использовать панель из нескольких микроРНК (miR-143, miR-26a, miR-145, miR-10b, miR-195 и miR-126), супрессированных у больных с развившимся рецидивом. В том же исследовании низкая экспрессия miR-127-3p, miR-145 и miR-126 ,

достоверно коррелировали с БРВ у пациентов без отдаленных метастазов [165]. Лучшие показатели БРВ у больных с высокой экспрессией miR-126 и низкие уровни у больных с развившимися метастазами были подтверждены в исследовании Khella et al (2015) [89]. Высокий уровень экспрессии miR-125b в опухоли указывал на плохой прогноз и ранний рецидив после нефрэктомии у больных со скПКР, особенно имеющих более высокие стадии болезни [67].

Повышенная экспрессия miR-122 и пониженная экспрессия miR-514 отмечена у больных с и без метастазов соответственно. Экспрессия miR-514 была особенно низкой у первично-метастатических пациентов, а также при развитии рецидива [189].

Другой группой авторов была показана связь уровня miR-21, miR-126 и miR-221 в отношении КСВ у больных скПКР, перенесших нефрэктомия с тромбэктомией при опухолевом тромбозе почечной и НПВ [177].

1.8.3 МикроРНК как биомаркеры ответа на лечение

Сигнатуры микроРНК, выделенной из периферической крови, потенциально могут стратифицировать пациентов с метастатическим раком почки в зависимости от их ответа на терапию сунитинибом. Двадцать восемь и 23 из 287 проанализированных микроРНК были ассоциированы с плохим ответом на терапию (менее 6 месяцев) или длительным ответом (более 18 мес), соответственно [68]. У больных с плохим ответом уровни экспрессии микроРНК (miR-192, miR-193a-3p и miR-501-3p) до и после лечения обладали прогностической значимостью. Для больных с длительным ответом на лечение значение имели изменения уровней экспрессии miR-410b, miR-1181c и miR-424c.

В исследовании Berkers et al (2013) ЭМП, контролируемый пониженной экспрессии miR-141 при скПКР был ассоциирован с плохим ответом на терапию сунитинибом [23]. Реактивация miR-141 *in vitro* приводила к реверсии ЭМП и улучшению жизнеспособности клеток в условиях гипоксии.

При сравнении двух групп пациентов с метастатическим ПКР, получавшие сунитиниб (резистентные к лечению и хорошо ответившие на сунитиниб), сравнивались в недавнем исследовании Prior et al. (2014). Обнаружено, что у пациентов, резистентных к сунитинибу miR-942, miR-628-5p, miR-133a и miR-484 были гиперэкспрессированы. Экспрессия miR-942 существенно отличалась между этими 2 группами пациентов.

При анализе ткани опухоли пациентов, высокий уровень экспрессии miR-942 был ассоциирован с более быстрым прогрессированием и худшей ОВ [146]. miR-30a является ингибитором аутофагии (которая способствует развитию резистентности к противоопухолевой терапии). Сорафениб-индуцированная цитотоксичность способствует увеличению экзогенной экспрессии miR-30a у больных с ПКР, вызывая апоптоз [208].

MiR-200c способствует повышению чувствительности скПКР к сорафенибу и иматинибу прицельно воздействуя на антиапоптотическую гемоксигеназу (НО-1). Была показана корреляция между уровнями экспрессии miR-200c и НО-1 и резистентностью к лечению [69].

1.8.4 Метилирование ДНК и ее значение для онкогенеза

Ковалентное добавление метильной группы к основанию цитозину приводит к образованию 5-метилцитозина, влияя на химический состав участка ДНК без изменения последовательности пуриновых оснований. Метилирование ДНК играет важную роль в регуляции экспрессии прилегающих генов и является ключевым регулятором в процессе органогенеза, а также в процессах старения и онкогенеза. [99,173]. Хорошо изучено метилирования CpG-обогащенных участков генома. Данные динуклеотиды распределены в геноме неравномерно, формируют CpG островки, которые преимущественно расположены в промоторной области генов [190]. Метилированные CpG островки способствуют стабилизации структуры хроматина и обычно ассоциированы с подавлением транскрипции расположенных рядом генов. Распределение и плотность метилированных

участков ДНК меняется в процессе злокачественной трансформации [21]. В частности, опухолевые клетки демонстрируют снижение метилирования участков ДНК по сравнению с здоровой тканью [158], что ведет к значительным изменениям в уровне экспрессии генов, включающем активацию онкогенов и подавление генов опухолевой супрессии и рассматриваются как один из факторов развития опухоли [190]. Так как метилирование ДНК является одним из наиболее ранних определяемых молекулярных изменений при раке, обладает стабильностью и может быть численно измерено, уровень метилирования является перспективным объектом изучения для понимания этиологии рака и его прогрессии, а также может служить клиническим биомаркером для диагностики, определения прогноза и выбора метода лечения [88,17].

1.8.5 Роль метилирования генов микроРНК

Гены микроРНК так же подвержены метилированию, как и гены, кодирующие белки [180]. Предполагается, что доля генов микроРНК, регулируемых посредством метилирования CpG-островков, в 5–10 раз выше, чем структурных генов [96]. Гиперметилирование, инактивирующее гены супрессорных микроРНК, выявлено как в гематологических, так и в солидных опухолях, включая острый миелоидный лейкоз, меланому, рак легкого, толстой кишки, желудка, молочной железы [21,145,9,6,147]. Значение гиперметилирования *miR-148a* было показано при опухолях головы и шеи, гепатоцеллюлярном раке и раке желудка [103,115,166]. Эпигенетическая инактивация *miR-130b* найдена при раке яичников [197], а *miR-107* – при раке поджелудочной железы [100], в то время как не обнаружена при раке легкого и молочной железы [9,6]. Как показано, профили гиперметилирования генов микроРНК могут использоваться как потенциальные биомаркеры для диагностики и прогноза при злокачественных новообразованиях [9,6]. К сожалению, анализ уровней гиперметилирования генов микроРНК при скПРК представлен единичными публикациями [22,7,3].

Как было показано, метилирование ДНК играет важную роль в этиологии и прогрессии рака почки, в частности, регулируя уровни экспрессии микроРНК.

Так, было обнаружено, что ингибирование транскрипции микроРНК *miR-10b* у пациентов со светлоклеточным раком почки связано с изменением статуса метилирования. Показано, что микроРНК *miR-10b* функционировала как опухолевый супрессор [79].

В базе данных TCGA также показано, что сниженная экспрессия *miR-10b*, *miR-21*, *miR-30a* связана с ДНК метилированием [54]. Метилирование генов, кодирующих микроРНК: *miR-9-1* и *miR-9-3* ($p < 0.001$) было обнаружено в 74 образцах светлоклеточного рака почки по сравнению с парными образцами здоровой ткани, что ассоциировано с достоверным снижением БРВ [84].

В публикациях Бресневой и соавт. (2013, 2017) была показана возможность использования для диагностики рака почки оценку метилирования генов 7 микроРНК (*miR-9-1/3*, *-34b/c*, *-124a-1/2/3*, *-129-2*) [3,4]. Апанович и соавт. изучен статус метилирования 8 генов микроРНК в 70 образцах рака почки для диагностики скПР. Использование генов микроРНК *miR-9-1*, *-34b/c*, *-124a-3*, *-129-2*; и *miR-130b* позволяет прогнозировать развитие рака почки с высокой чувствительностью (90 %) и специфичностью (94 %) [1]. В исследовании Логинова и соавт (2017) впервые выявлена статистически значимая ассоциация метилирования гена *miR-107* с поздней клинической стадией и метастазированием скПР, а также гена *miR-130b* – с поздней клинической стадией и увеличением размера опухолей [113].

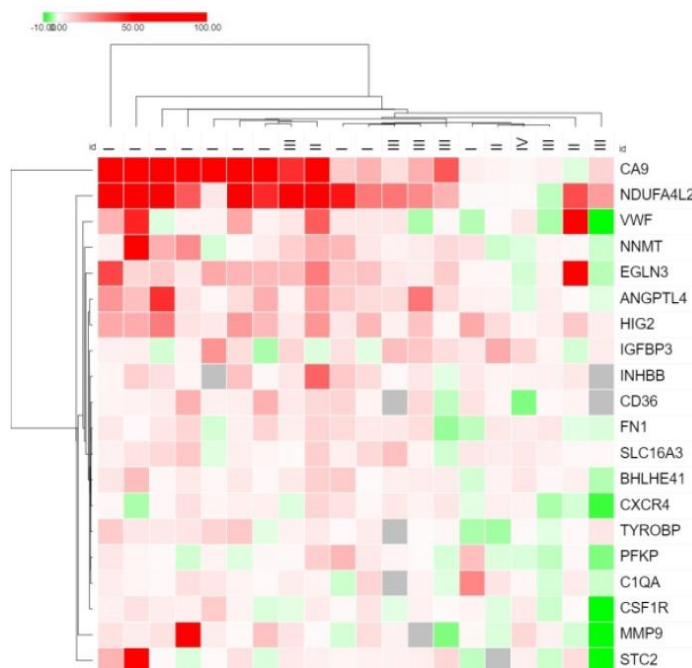
1.8.6 Выбор белок-кодирующих генов и генов микроРНК для определения уровня экспрессии

Основой для выбора набора белок-кодирующих генов для нашего анализа явились проведенные ранее совместные научно-исследовательские работы ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и лаборатории молекулярной генетики сложно-наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-

генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» [12]. Предметом проведенных работ явилось изучение дифференциальной экспрессии набора из 200 генов в опухолевой и здоровой ткани у больных раком почки. Для предварительного отбора генов с целью последующего экспериментального изучения были проанализированы микрочиповые экспрессионные данные при скПКР, используя базы по экспрессионным данным, такие как: OncoPrint (www.oncoprint.org), GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), CGED (<http://lifesciencedb.jp/cged/>). При этом был сформирован набор из генов, характеризующихся наиболее выраженным изменением уровня экспрессии относительно нормальной ткани почки. Критерием выбора генов являлась экспрессия, повышенная более чем в 2 раза, в более 50% образцов скПКР.

На второй стадии был проведен скрининговый анализ экспрессии этих генов на 30 парных образцах опухолевой и морфологически здоровой ткани с использованием ПЦР в реальном времени. Результатом явилось выделение 20 генов с наиболее дифференциальной экспрессией в здоровой ткани почки и опухолевой ткани (Рисунок 1).

Из 20 генов была проанализирована панель из 10 наиболее перспективных генов. В результате анализа выявили, что экспрессия 8 (*CA9*, *NDUFA4L2*, *VWF*, *IGFBP3*, *BHLHE41*, *EGLN3*, *SAA1* и *C1QA*) из 10 анализируемых генов имеет статистически значимую связь с метастазированием скПКР. Значимость различий сохранялась и при применении поправки Бенджамини-Хохберга на множественность сравнений (FDR). То есть снижение уровня экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *VWF*, *IGFBP3*, *BHLHE41*, *EGLN3* и *C1QA* являлось неблагоприятным прогностическим фактором для развития метастазов.



Клинические стадии заболевания обозначены римскими цифрами в верхнем ряду рисунка

Рисунок 1 - Тепловая карта экспрессии 20 генов в образцах опухоли больных скПКР [12]

По набору статистических признаков ($AUC > 0,8$, наибольшие значения OR и линейная сепарабельность уровней экспрессии между метастазирующими и неметастазирующими опухолями) было выделено четыре гена в качестве наиболее сильных кандидатов в биомаркеры метастазирования скПКР: *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE41*, *EGLN3*. Набор из этих 4 генов является материалом изучения настоящего исследования совместной экспрессии белок-кодирующих генов и генов микроРНК у новой когорты из 80 больных скПКР.

Метилирование супрессорных и антиметастатических генов рассматривается как критические факторы развития и прогрессирования опухоли, и гиперметилированные гены могут найти применение как диагностические и как прогностические маркеры онкологического заболевания. Гены микроРНК, как и гены, кодирующие белки, тоже подвержены метилированию. Гиперметилированные гены микроРНК могут представлять новые эффективные биомаркеры рака. В связи с вышесказанным, мы исследовали уровни

метиляции 9 генов микроРНК (*miR1258*, *miR34B/C*, *miR107*, *miR132*, *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR203A*). Группа генов микроРНК, взятая для анализа связи с метастазированием светлоклеточного рака почки, была отобрана на основании ранее опубликованных данных Логинова и соавт. (2017) [113], показавших ассоциацию данных генов с метастазированием.

Заключение

Таким образом, как следует из анализа данных литературы, несмотря на интенсивный поиск надежных молекулярных биомаркеров для ранней диагностики, определения прогноза, оценки эффективности терапии и мониторинга лечения у больных раком почки, данная задача остается нерешенной из-за недостаточной диагностической точности предложенных маркеров и отсутствия подтверждения их значимости на больших проспективных когортах пациентов. Учитывая важную прогностическую роль экспрессии различных белок-кодирующих генов и метилирования генов микроРНК у больных раком почки, мы предположили, что одновременное определение уровня экспрессии и метилирования этих генов может помочь создать прогностические модели с более высокой чувствительностью и специфичностью, чем существующие на данный момент.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Общая характеристика материала

Данная работа представляет собой ретроспективное исследование, основанное на анализе результатов молекулярно-генетического исследования парных образцов опухолевой и здоровой ткани, полученных после хирургического лечения 80 больных светлоклеточным раком почки, проведенного в отделении онкоурологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2021г. по 2023 г. Исследование проводилось совместно с лабораторией молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова». Мужчин было 46 (57,5%), женщин 34 (42,5%).

Критериями включения больных в исследование являлось:

1. наличие светлоклеточного варианта рака почки по данным морфологического анализа операционного материала;
2. отсутствие других онкологических заболеваний в анамнезе;
3. отсутствие семейного онкологического анамнеза (онкологических заболеваний у ближайших родственников: родители, брат, сестра);
4. отсутствие наследственных неонкологических синдромов;
5. добровольное согласие пациентов на проведение молекулярно-генетического анализа биологического материала.

У всех больных произведен сбор медицинских данных относительно исходных характеристик опухолевого процесса, сбор жалоб, анамнеза, осмотр. Методы обследования пациентов для стадирования заболевания включали обязательную компьютерную томографию грудной клетки, брюшной полости и малого таза с внутривенным контрастированием, при необходимости дополненную МРТ органов брюшной полости. Сроки выполнения и технические особенности хирургического лечения (радикальная нефрэктомия или резекция почки), патоморфологическое исследование послеоперационного материала

(гистологическое исследование, иммуногистохимическое исследование) фиксировались в базе данных для последующего анализа.

2.2 Характеристика клинического материала

Образцы опухоли, полученные во время хирургического вмешательства у 80 пациентов, а также парные образцы морфологически здоровой ткани почки собирались с соблюдением принципов конфиденциальности. Дизайн исследования был утвержден комитетом по этике медико-генетического научного центра им. акад. Н.П. Бочкова (№ 2017-4/2). После забора ткань сразу замораживалась и хранилась при температуре -70°C . Медиана возраста пациентов составила 62 (38-79) года. У 31 пациента имелись отдаленные метастазы на момент включения в исследование. У 49 больных по данным проведенного обследования опухолевый процесс носил локализованный характер. Морфологически все образцы опухоли имели строение светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР) согласно гистологическому исследованию (Таблица 1).

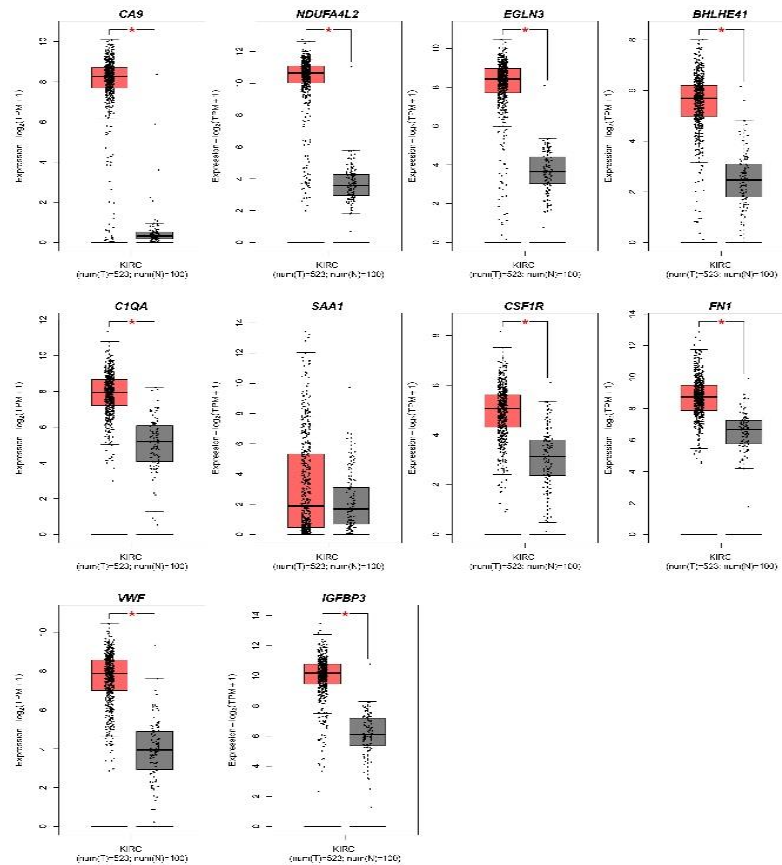
Таблица 1 - Характеристика распространенности опухоли у 80 пациентов скПКР

Характеристика		Количество образцов
Стадия TNM	I	20
	II	6
	III	22
	IV	32
Наличие метастазов	С отдаленными метастазами	31
	Без метастазов	49

Локализация отдаленных метастазов	Легкие	19
	Надпочечник	9
	Кости	3
	Другие	3

2.3 Формирование выборки генов для исследования

До проведения анализа материала, полученного в результате хирургического лечения 80 больных светлоклеточным раком почки, нами был проведен расширенный анализ генов, первоначально отобранных в лаборатории в качестве генов, ассоциированных с прогрессией рака почки. Критерием включения гена в выборку являлось наличие повышенного в два и более раз по сравнению с контролем (уровень экспрессии в здоровой ткани почки) уровня экспрессии гена в опухолевой ткани. На основании этих критериев было отобрано десять генов: *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE41*, *EGLN3*, *VWF*, *IGFBP3*, *SAA1*, *C1QA*, *FNI*, *CSF1R* [2,11,12]. Выборку генов дополнительно оценили с использованием биоинформационного ресурса GEPIA2 [70], который содержит данные секвенирования нового поколения (NGS), позволяющие оценить уровни экспрессии генов в опухолевой и нормальной тканях и включает 523 образца скПР, а также 100 образцов нормальной ткани почки от здоровых доноров (Рисунок 2).



Красным отмечен уровень экспрессии гена в опухолевой ткани, серым – в нормальной ткани. Уровни экспрессии генов (– transcripts per million reads; число транскриптов на миллион картированных прочтений) представлены в логарифмической шкале. Линией отмечено среднее значение экспрессии в каждой группе, «прямоугольник» – 25-75%, «усы» – 1,5 межквартильных интервала. Значимость различий определялась методом ($<0,01$).

Рисунок 2 - Уровни экспрессии тестируемых генов в GEPiA2 на образцах опухолевой и нормальной ткани почки по данным биоинформационного анализа

Проведенный анализ показал, что значимые отличия между нормой и опухолью по уровню экспрессии наблюдается для всех отобранных генов. Для оценки связи полученных результатов с метастазированием и уточнения полученных результатов была сформирована выборка парных образцов на основании операционного материала, собранного в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Выборка содержала 56 парных образцов

опухоль и соответствующая ей нормальная ткань больных светлоклеточным раком почки. (Таблица 2)

Таблица 2 - Характеристика распространенности опухоли у 56 пациентов скПКР

Классификация		Количество образцов
По TNM стадиям	I	11
	II	6
	III	5
	IV	34
По наличию отдаленных метастазов	С метастазами	34
	Без метастазов	22

Уровень экспрессии десяти генов в этих образцах проанализировали методом количественной ПЦР. Выборка была разделена на две группы образцов. В группу без метастазирования вошло 22 образца, в группу с метастазами 34 образца. Для выявления ассоциации экспрессии генов с наличием метастазов провели ROC-анализ (Таблица 3).

Таблица 3 - Ассоциация экспрессии генов с наличием метастазов, ROC-анализ

Ген	Площадь под ROC-кривой (AUC)	95%ДИ	Уровень значимости, P
<i>CA9</i>	0,891	0,804 - 0,978	<0,001
<i>NDUFA4L2</i>	0,811	0,672 - 0,951	<0,001
<i>BHLHE41</i>	0,808	0,691 - 0,925	<0,001
<i>EGLN3</i>	0,873	0,760 - 0,986	<0,001
<i>VWF</i>	0,788	0,659 - 0,917	<0,001
<i>IGFBP3</i>	0,714	0,572 - 0,856	0,003
<i>SAA1</i>	0,689	0,537 - 0,841	0,015

Продолжение таблицы 3

<i>CIQA</i>	0,693	0,552 - 0,833	0,007
<i>FNI</i>	0,568	0,412 - 0,724	0,198
<i>CSF1R</i>	0,547	0,389 - 0,705	0,562

На основании полученных данных для дальнейшего исследования было отобрано 4 гена *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE41*, *EGLN3*. Основным критерием включения этих генов в дальнейшее исследование являлось значение $AUC > 0,8$.

Для оценки молекулярных процессов, связанных с эпигенетической регуляцией прогрессии опухоли, были изучены гены микроРНК (Таблица 4).

Таблица 4 - Список генов микроРНК, отобранных для анализа

Ген	Локализация на хромосоме	Источник литературы
<i>miR1258</i>	2q31.3	86, 29
<i>miR34B/C</i>	11q23.1	86, 3, 61
<i>miR107</i>	10q23.31	86, 29
<i>miR132</i>	17p13.3	114, 86, 29
<i>miR125B-1</i>	11q24.1	114, 86, 29
<i>miR137</i>	1p21.3	114, 86, 205, 107, 61
<i>miR375</i>	2q35	114, 86, 182, 199
<i>miR193A</i>	17q11.2	114, 86, 201
<i>miR203A</i>	14q32.33	114, 86, 29

Выборка генов для исследования была сформирована на основании анализа литературных данных. Критерием включения являлось документированное метилирование гена при прогрессии опухоли почки. На основании литературных данных были отобраны следующие гены *miR1258*, *miR34B/C*, *miR107*, *miR132*, *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR203A*. Дополнительный анализ показал,

что отобранные гены расположены в разных хромосомах и косвенно отражают степень метилирования различных областей генома.

2.4 Выделение высокомолекулярной ДНК

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции. Образцы, полученные в ходе оперативного вмешательства, измельчали и помещали в пробирки с буфером следующего состава: 10мМ Tris-HCl, pH 7.8; 5мМ ЭДТА; 0.1М NaCl; 1.0% SDS (додецилсульфат натрия). Затем вносили протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл. Содержимое пробирок инкубировали при 37°C в течение 16-ти часов (ночь). Затем, в каждую пробирку добавляли равный объём фенола, насыщенного раствором Tris-HCl (pH 8.0) и перемешивали. Разделение водной и фенольной фазы проводили центрифугированием. Верхнюю фазу, содержащую ДНК, переносили в чистые пробирки, и процедуру повторяли трижды. На заключительном этапе водную фазу однократно смешивали с равным объемом смеси фенол: хлороформом в соотношении 1:1. На заключительном этапе водный раствор ДНК трижды обрабатывали равным объемом хлороформа. Верхнюю фазу отбирали, переносили в чистую пробирку. От остатков хлороформа избавлялись переосаждением ДНК спиртом. Полученный осадок промывали 70% этиловым спиртом, подсушивали и растворяли в TE буфере (10мМ Tris-HCl, pH 8.0). Проверку химической чистоты ДНК и определение её концентрации осуществляли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Пригодными для дальнейшего использования считали образцы со следующими характеристиками: A260/A280 составил 1.83–1.95, A260/A235 = 2.21–2.56. Качественную оценку ДНК проводили при помощи анализа результатов электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. В качестве стандарта использовали ДНК фага λ с известной концентрацией (0.3 мкг/мкл). [73]

2.4.1 Выделение суммарной РНК. Проверка качества и измерение концентрации РНК

Для выделения тотальной РНК из ткани использовали набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, ткань гомогенизировали и смешивали с 10 кратным по объему RLT буфером, после чего РНК экстрагировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течении 30 минут, осадок удаляли центрифугированием. Супернатант переносили в новую пробирку и смешивали с равным объемом 70% этанола. Полученный этанольный раствор наносили на колонку RNeasy spin column для связывания носителя с молекулами РНК. Промывку связавшейся РНК осуществляли с использованием коммерческого буфера RW1 и RPE. Очищенную РНК элюировали с колонки водой свободной от нуклеаз. Выделенную РНК хранили при температуре -80°C . Проверка качества и измерение концентрации РНК. Качество выделенных фракций РНК проверяли с помощью электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. Продукты разделения визуализировали при помощи интеркалирующего красителя, бромистый этидий, в УФ спектре на приборе для визуализации гелей Quantum-CX5 Edge (Vilber, Франция). РНК считали пригодной для анализа при наличии четких полос в агарозном геле, соответствующих 18S и 28S рРНК.

Концентрацию и химическую чистоту водного раствора РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer Pearl UV/Vis (Implen, ФРГ). РНК считали пригодной для анализа при соотношении $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$ и $A_{260}/A_{230} = 2,0-2,2$.

2.4.2 Проведение реакции обратной транскрипции

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). В экспериментах использовали выравненные по концентрации образцы РНК, на одну реакцию обратной транскрипции

использовали от 0,6 до 1,7 мг РНК. Отжиг гексапраймеров осуществляли при температуре 70 °С. Синтез комплементарной цепи проводили с использованием фермента MMLV ревертазы при 42°С в течении 60 мин. Для остановки реакции использовали прогревание образца в течении 10 минут при температуре 70°С.

2.4.3 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для проведения количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали коммерческие наборы TaqMan® Gene Expression Assay (Assay ID: Hs02758991_g1, Hs00154208_m1, Hs00220041_m1, Hs00222966_m1, Hs00229146_m1, Hs01109446_m1, Hs00181211_m1, Hs00761940_s1, Hs00706358_s1, Hs01549976_m1, Hs00911250_m1) и TaqMan® Gene Expression Master Mix. Экспрессию каждого гена анализировали в трех повторностях. Реакционная смесь получали смешиванием: 1мкл коммерческого зонда TaqMan для соответствующего гена с 10 мкл реакционной смеси TaqMan® Gene Expression Master Mix и 7,4 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили в термоциклере QuantStudio 5 Real-Time-PCR (Applied Biosystems, США). Во всех случаях использовали режим амплификации:

первоначальная денатурация 50°С – 2 мин

денатурация 95°С – 600 сек

денатурация 95°С – 15 сек

отжиг, синтез 60°С – 60 сек 45 циклов

Расчет относительной экспрессии проводили с помощью программного обеспечения QuantStudio™ Design & Analysis Software методом $\Delta\Delta C_t$ (RQ). В качестве эндогенного контроля использовали ген GAPDH.

2.5 Анализ экспрессии генов

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора ImProm-II™ Reverse Transcription System (США). Концентрации РНК

выравнивали в контрольных и экспериментальных образцах. После этого водный раствор РНК (0,3 – 1,5 мкг/мкл) смешивали с гексапраймером Random 6 и реакционной смесью (буфер 5x, MgCl₂ – 25mM, dNTP – 10 mM, обратная транскриптаза) вышеупомянутого набора и проводили реакцию в термоциклере (ЗАО НПФ ДНК - Технология, Россия). С заданной программой 25⁰С – 10 мин., 42⁰С – 1 час, 70⁰С – 10 мин.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) осуществляли с использованием наборов компании Applied Biosystems, США: TaqMan® Gene Expression Master Mix (2-х кратная универсальная реакционная смесь для исследования уровня экспрессии генов методом ПЦР-РВ) и TaqMan® Gene Expression Assay, (реакционная смесь праймеров и флюоресцентно-меченного олигонуклеотида) специально разработанного для каждого анализируемого гена (*GAPDH*, *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3* и *BHLHE41*). В качестве эндогенного контроля использовали ген *GAPDH*.

Оценку относительного уровня экспрессии мРНК гена в опухолевой ткани относительно уровня экспрессии того же гена в нормальной ткани одного образца почки проводили с использованием программного обеспечения QuantStudio™ Design & Analysis Software методом $\Delta\Delta C_t$ (RQ).

2.6 Анализ метилирования генов микроРНК

Бисульфитная конверсия ДНК в растворе. Рабочий раствор для бисульфидной конверсии готовили на основе навески метабисульфита натрия (Na₂S₂O₅), гидрохинона (C₆H₄(OH)₂) и воды. На 10 мл раствора расходовали 4.6 г метабисульфита натрия и 22 мг гидрохинона (рН раствора 5.5). ДНК денатурировали в 0.3М NaOH при 500С в присутствии тРНК, конечная концентрация 0,04 мкг/мкл. Смешивали с рабочим раствором для конверсии и инкубировали при 54 0С в течении 16 часов. Очистку ДНК после конверсии проводили при помощи колонок Centrifugal Filter Microcon, Ultracel YM-30

(Millipore, США) и пересаживанием 96% этанолом. Полученные образцы использовали в качестве матрицы при проведении метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) и/или количественной МС-ПЦР в реальном времени.

Метил-специфичная полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР). Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. Режим ПЦР: один цикл 95°C, 5 мин; 35 циклов {95°C, 10 с; Тотж, 20 с; 72°C, 30 с}; один цикл 72°C, 3 мин. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, Thermo Scientific, USA) использовали как контроль для метилированного аллеля, а препарат ДНК человека (#G1471, Promega, USA) – как контроль для неметилированного аллеля. Анализ продуктов ПЦР проводили с использованием 2% агарозного геля.

Для проведения количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (кМС-ПЦР-РВ) использовали обработанную бисульфитом ДНК из опухолевой и нормальной ткани. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса гена АСТВ с использованием олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 1xqPCRmix-HS SYBR, который содержит HS Taq ДНК-полимеразу, интеркалирующий краситель SYBR Green I, смесь всех dNTP в концентрации 0.2мМ, 3мМ Mg²⁺ и реакционный буфер; 0.4мкМ каждого праймера; 20–50 нг ДНК-матрицы. Полимеразную цепную реакцию осуществляли в 96-луночных планшетах «Optical Reaction Plate» на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (BioRad, США) по следующей программе: 95°C, 5 мин – предварительная денатурация; 40 циклов ПЦР {95°C, 30с; Тотж, 30с; 72°C, 30с}. Плавление продуктов амплификации проводили в диапазоне 55-95°C с увеличением температуры на 0,5°C каждые 10 с. Амплификацию каждого образца повторяли трижды. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве положительного контроля 100%-ого метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”). Обработку собранных данных проводили при помощи программного обеспечения Precision Melt Analysis Software (BioRad).

На завершающем этапе уровень метилирования образцов оценивали по рассчитанному индексу метилирования (ИМ): $ИМ = 100 \times (\text{число метилированных копий гена (M)} / (\text{число метилированных копий гена (M)} + \text{число неметилированных копий гена (U)}))$. ИМ представляет собой непрерывное значение в диапазоне от 0 до 100%, и его можно интерпретировать как процент метилирования, при этом ИМ=0 означает полное отсутствие модификации, а ИМ=100% - полное метилирование гена (van Hoesel et al., 2013).

2.7 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ «IBM SPSS Statistics 22» и MedCalc (MedCalc Software Ltd., Бельгия). Для поиска корреляций с метастазированием (определения различий уровня относительной экспрессии генов между группами с метастазами и без метастазов) применялся U-критерий Манна-Уитни. Для прогнозирования количественной (непрерывной) вероятности появления метастазов в зависимости от уровня экспрессии/метилирования 9 выбранных генов и получения предиктивных моделей для категориальных данных (с использованием категориальной переменной, кодирующей факт появления или не появления метастазов) использовали метод логистической регрессии. Для оценки качества, полученного с помощью логистической регрессии решения задачи классификации, использовали р-значения, малое значение которого свидетельствует о том, что прогноз о наступлении события является статистически значимым, является корректным. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$.

ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) был проведен с использованием программы MedCalc. Были построены ROC-кривые, определены AUC (Area Under Curve, площадь под ROC-кривой) и оптимальное значение величины порога отсечения (точки cut off). Значение cut off соответствуют максимально возможной суммарной чувствительности и специфичности для данного диагностического теста. Чувствительность – доля

истинно положительных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом. Специфичность – доля истинно отрицательных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом. ROC-кривая показывает зависимость количества верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров. Для идеального теста кривая проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных случаев составляет 100% или 1.0 (идеальная чувствительность), а доля ложно положительных примеров равна нулю. Наоборот, чем меньше изгиб кривой и чем ближе она расположена к диагональной прямой, тем менее качественен тест.

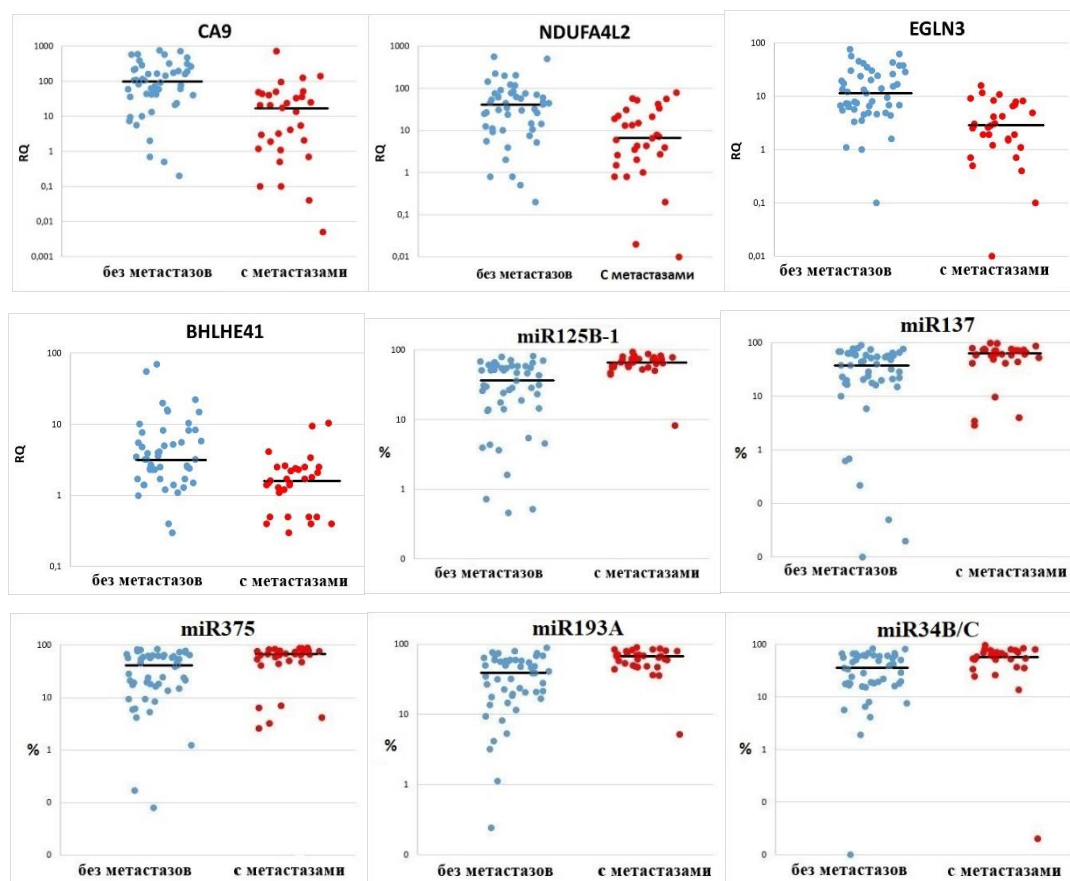
При предварительном отборе кандидатов в биомаркеры метастазирования в качестве численной оценки значимости клинического теста (классификации) использовали показатель AUC с критерием отбора $AUC > 0.7$ (чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор, $AUC = 0.5$ при случайной классификации и $AUC = 1$ при идеальной классификации) [5,8]. Значения чувствительности и специфичности, с использованием которых строилась ROC-кривая, вычислялись с помощью онлайн-калькулятора [121].

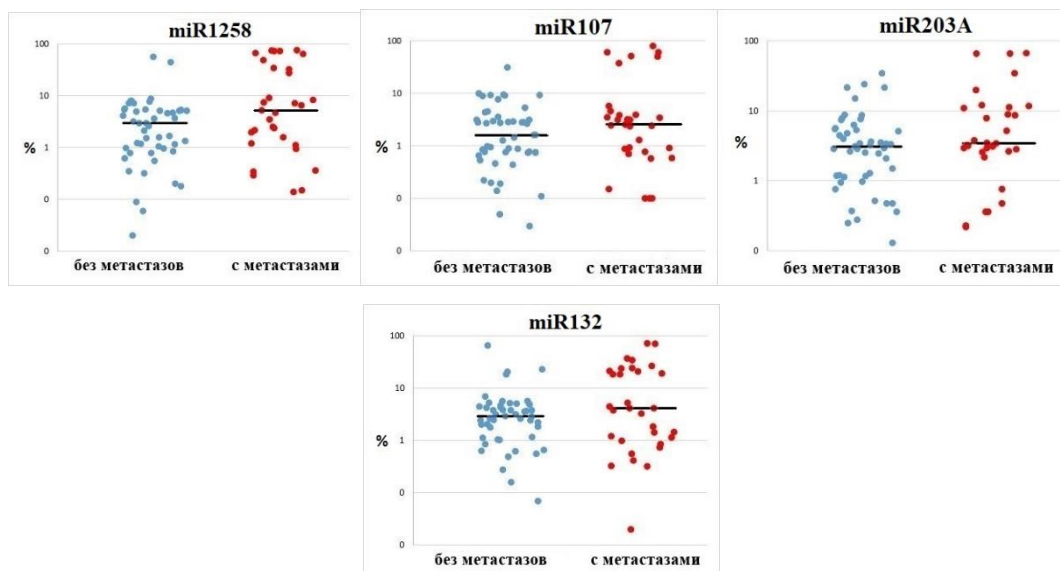
В дальнейшем эффективность выбора биомаркеров метастазирования исследовалась путем анализа показателей чувствительности и специфичности предиктивных моделей для предсказания метастазирования, построенных на основе выбранных биомаркеров; для оценки этих показателей использовалась технология перекрестной проверки (кросс-валидации).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Анализ уровней экспрессии белок-кодирующих генов и уровня метилирования генов микроРНК с развитием метастазов скПКР

В 80 парных образцах ткани пациентов с метастатическим и неметастатическим скПКР были определены уровни экспрессии белок-кодирующих генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* и проведен анализ уровней метилирования генов микроРНК *miR1258*, *miR34B/C*, *miR107*, *miR132*, *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR203A*. Результат анализа уровней экспрессии и уровней метилирования представлен на рисунке 3 и в таблице 5.





В группах без метастазов (●) и с метастазами (●). Значения экспрессии и метилирования генов представлены в логарифмической шкале. Линией отмечена медиана

Рисунок 3 - Относительная экспрессия (RQ) и индекс метилирования генов (%)

Результаты исследования показали, что снижение уровня экспрессии всех четырех исследуемых генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* связано с метастазированием опухоли (Таблица 5).

Таблица 5 - Значения медиан уровней экспрессии генов и значимость их различий в группах опухолей скПКР

Ген	Медиана экспрессии		Mann–Whitney U-test, p =	Логистическая регрессия, p =
	без метастазов	с метастазами		
<i>CA9</i>	92.7	17.8	<0.001	0.022
<i>NDUFA4L2</i>	41.1	6.5	<0.001	0.007
<i>EGLN3</i>	11.4	2.8	<0.001	0.004
<i>BHLHE41</i>	3.2	1.6	<0.001	0.018

Связь уровней метилирования генов микроРНК с метастазированием носила выборочный характер. При этом увеличение уровня метилирования всех значимо отличающихся генов указывает на метастатический потенциал опухоли.

Наиболее специфичные значения были получены для пяти генов *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* из девяти (Таблица 6).

Таблица 6 - Значения медиан уровней метилирования генов и значимость их различий в группах опухолей скПКР

Ген	Медиана метилирования		Mann–Whitney U-test, p =	Логистическая регрессия, p =
	Без метастазов	С метастазами		
<i>miR125B-1</i>	36.27	66.34	<0.001	<0.001
<i>miR137</i>	38.10	61.84	0.001	0.006
<i>miR375</i>	38.99	66.19	0.002	0.007
<i>miR193A</i>	38.99	67.58	<0.001	<0.001
<i>miR34B/C</i>	35.26	59.23	0.001	0.004
<i>miR1258</i>	2.97	5.19	0.040	0.010
<i>miR107</i>	1.62	2.57	0.252	0.036
<i>miR203A</i>	3.11	3.42	0.235	0.061
<i>miR132</i>	2.9	4.17	0.252	0.036

Примечание: уровни значимости (p) представлены с учетом коррекции методом Бенджамини–Хохберга.

3.2 Составление панели маркеров метастазирования

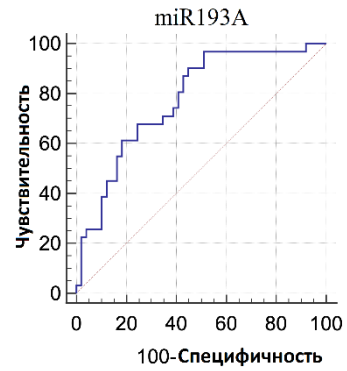
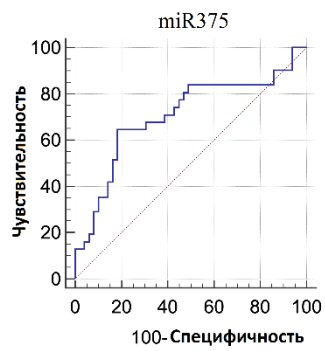
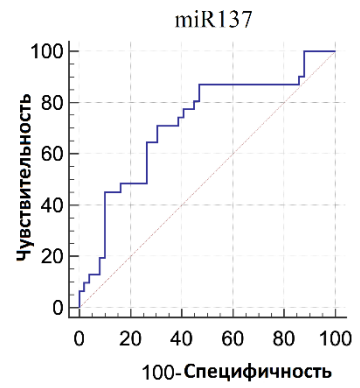
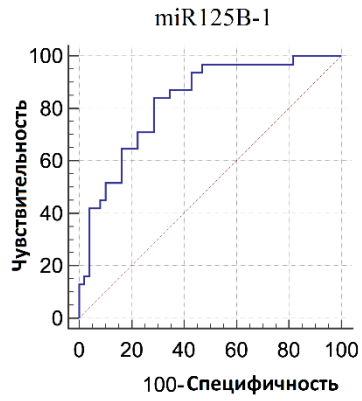
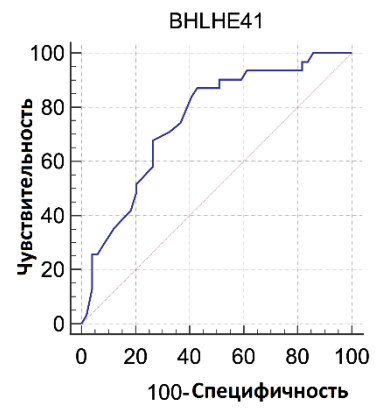
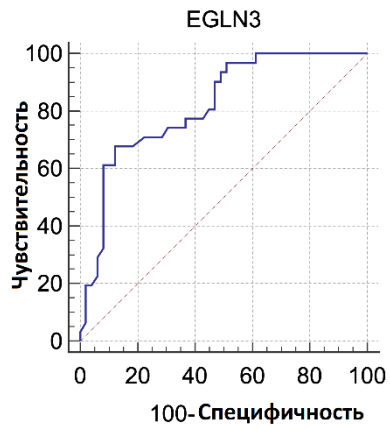
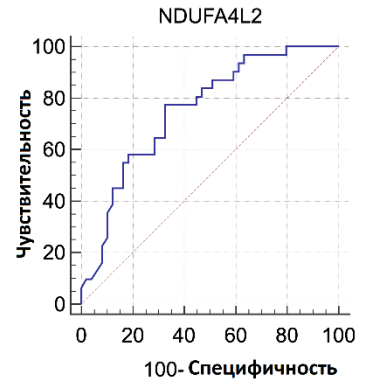
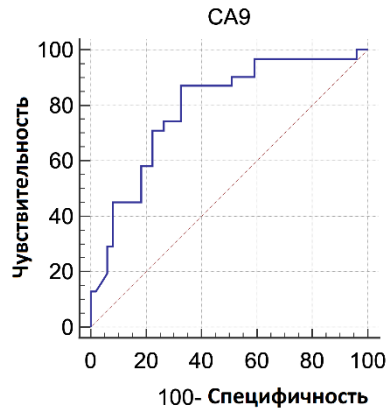
Согласно полученным результатам, был проведен анализ возможности использования выявленных генов в качестве потенциальных маркеров метастазирования. Для дальнейшего анализа были отобраны гены: *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*, *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* и

miR1258, которые показали значимую связь с метастазированием при анализе U-test и логистической регрессии. Для анализа характеристик связи уровней экспрессии и метилирования генов с метастатическим потенциалом опухоли использовали ROC-анализ (Таблица 7, Рисунок 4).

Таблица 7 - Параметры ассоциации уровней экспрессии и метилирования генов с метастазированием скПКР

Ген	Площадь под кривой (AUC)	95% CI	Пороговое значение	Достоверность p (Area=0.5)	Чувствительность	Специфичность
<i>CA9</i>	0.789	0.684 – 0.873	≤51.3*	<0.001	87.10	67.35
<i>NDUFA4L2</i>	0.753	0.644 – 0.842	≤22*	<0.001	77.42	67.35
<i>EGLN3</i>	0.818	0.716 – 0.895	≤4.2*	<0.001	67.74	87.76
<i>BHLHE41</i>	0.751	0.642 – 0.841	≤2.6*	<0.001	87.10	57.14
<i>miR125B-1</i>	0.827	0.726 – 0.902	>55.18**	<0.001	83.87	71.43
<i>miR137</i>	0.716	0.604 – 0.811	>57.62**	<0.001	70.97	69.39
<i>miR375</i>	0.706	0.593-0 0.802	>64.29**	0.001	64.52	81.63
<i>miR193A</i>	0.776	0.668 – 0.861	>34.65**	<0.001	96.77	48.98
<i>miR34B/C</i>	0.732	0.621 – 0.825	>50.35**	<0.001	77.42	65.31
<i>miR1258</i>	0.644	0.529 – 0.748	>7.15**	0.035	45.16	87.76

Примечание: * - уровень экспрессии; ** - уровень метилирования



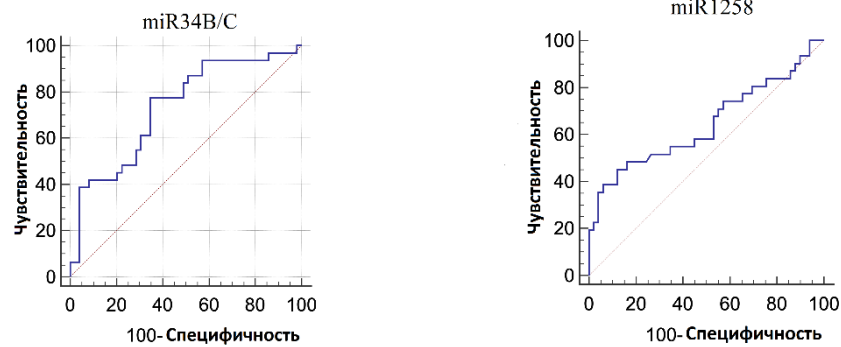


Рисунок 4 - ROC-кривые, полученные при анализе ассоциации уровней экспрессии и метилирования генов с метастазированием скПКР

В результате проведенного анализа определили, что достоверную значимость для составления панели маркеров метастазирования имеют гены *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*, а среди генов микроРНК наилучшими качествами классификатора обладают *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*. При этом, неблагоприятным прогнозом для развития метастазов является снижение уровня экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* и увеличение уровня метилирования генов, кодирующих микроРНК *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*. Для этих генов показатели чувствительности находятся в диапазоне 65% - 97%, а специфичности - в диапазоне 49% - 88%.

Следовательно, различия значений медиан уровней экспрессии, метод логистической регрессии и ROC-анализ указывают на связь девяти изученных генов с метастазированием скПКР.

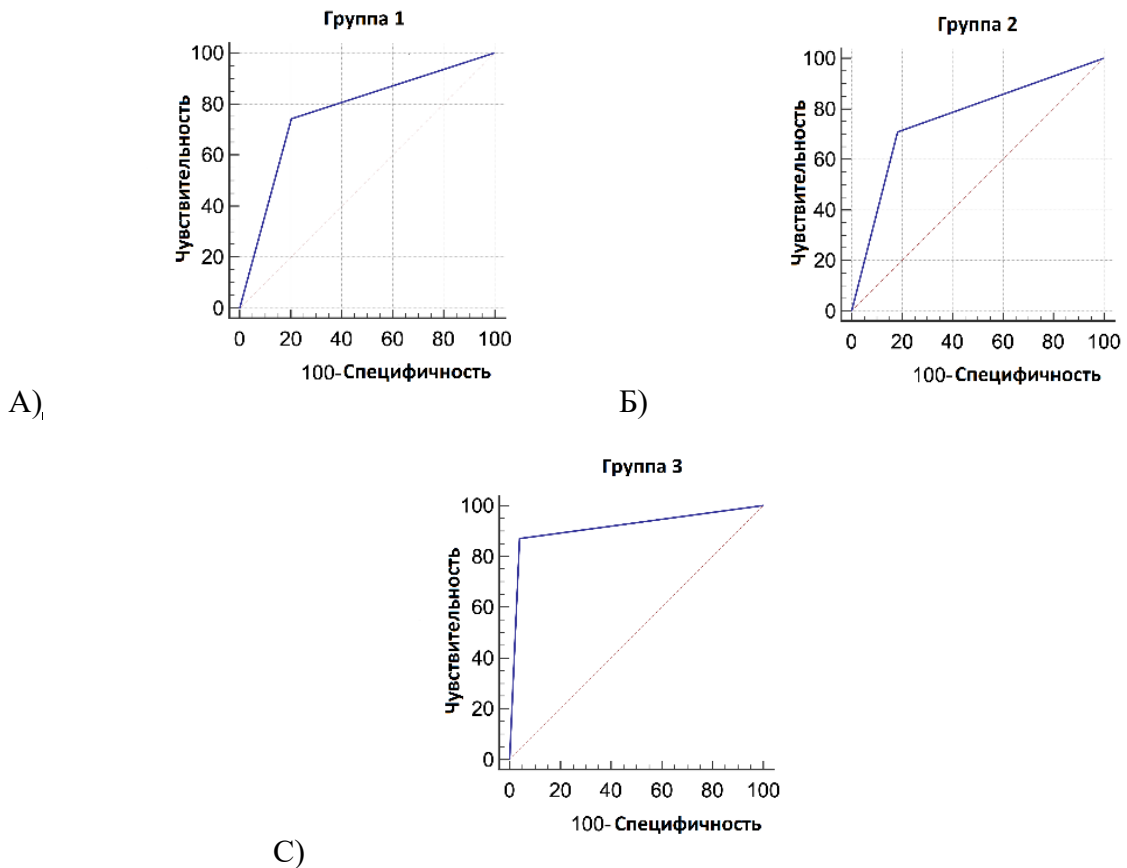
3.3 Оценка прогностической значимости отобранных маркеров

По характеристике $AUC > 0,7$ выделили девять генов в качестве наиболее достоверных кандидатов в биомаркеры метастазирования скПКР. С целью улучшения показателей чувствительности и специфичности, а также повышения практической значимости полученных данных были составлены три предиктивные модели, в каждой из которых анализировалась группа генов.

Проведена оценка их прогностической значимости для возможности последующего использования в молекулярно-генетическом тестировании образцов ткани светлоклеточного рака почки (Таблица 8, Рисунок 5).

Таблица 8 - Характеристика комбинированных прогностических панелей на основе белок-кодирующих генов и генов микроРНК

Группа генов	Чувствительность/ специфичность	Площадь под кривой (AUC)	Достоверность p (Area=0.5)	Отрицательное предсказательное значение % (95 % CI)	Положительное предсказательное значение % (95 % CI)
<i>CA9</i> <i>NDUFA4L</i> 2 <i>EGLN3</i> <i>BHLHE41</i>	74.19/79.59	0.769	<0.0001	82.98 (69.19 - 92.35)	69.70 (51.29 - 84.41)
<i>miR125B-1</i> <i>miR137</i> <i>miR375</i> <i>miR193A</i> <i>miR34B/C</i>	70.97/81.63	0.763	<0.0001	81.63 (67.98 - 91.24)	70.97 (51.96 - 85.78)
<i>CA9</i> <i>NDUFA4L</i> 2 <i>EGLN3</i> <i>BHLHE41</i> <i>miR125B-1</i> <i>miR137</i> <i>miR375</i> <i>miR193A</i> <i>miR34B/C</i>	87.10/95.92	0.915	<0.0001	92.16 (81.12 - 97.82)	93.10 (77.23 - 99.15)



А) CA9, NDUFA4L2, EGLN3, BHLHE41; Б) miR125B-1, miR137, miR375, miR193A, miR34B/C; В) CA9, NDUFA4L2, EGLN3, BHLHE41, miR125B-1, miR137, miR375, miR193A, miR34B/C

Рисунок 5 - ROC анализ панели маркеров

Одновременный анализ уровня экспрессии белок-кодирующих генов генов (*CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*) и/или метилирования генов микроРНК (*miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*) повышает надежность метода. О повышении надежности метода. в данном случае, говорит снижение вероятности случайной ассоциации маркера с метастазированием скПКР.

3.4 Способ прогнозирования метастазирования скПКР

В таблице 9 представлены результаты экспрессии 4 белок-кодирующих генов и метилирования 5 генов микроРНК, прогноз метастазирования, основанный на экспрессии белок-кодирующих генов (модель 1), на экспрессии

генов микроРНК (модель 2), и комбинированной панели из 9 генов (модель 3), а также реальное состояние метастазирования на момент хирургического лечения 80 пациентов со светлоклеточным раком почки (M0 - отсутствие метастазов, M1 - наличие отдаленных метастазов). Красным цветом отмечены белок кодирующие гены с уровнем экспрессии ниже порогового значения и гены микроРНК с уровнем метилирования выше порогового значения, являющиеся положительными маркерами метастазирования.

При практическом использовании панели маркеров из четырех белок-кодирующих генов (*CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*) присутствие одновременно хотя бы трех положительных маркеров (красный цвет ячейки) можно считать положительным результатом, так как опухоль обладает повышенным метастатическим потенциалом (Таблица 9). В данном случае маркером считается уровень экспрессии ниже порогового значения, определенного при ROC-анализе для каждого гена. В случае применения панели из пяти генов микроРНК (*miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*) положительным результатом можно считать присутствие одновременно хотя бы четырех маркеров. В этом случае маркером считается уровень метилирования выше порогового значения, определенного при ROC-анализе для каждого гена. И для панели из девяти генов положительным результатом можно считать присутствие одновременно хотя бы шести положительных маркеров.

Соответствующий расчет на основе полученных данных показывает, что наилучшими показателями чувствительности (87%) и специфичности (96%) обладает комбинированная панель на основе одновременного измерения уровней экспрессии и уровней метилирования вышеуказанных генов. При этом она является и наиболее надежной предсказательной панелью. В то же время, в случае ограниченных возможностей, определение только уровней экспрессии, либо только уровней метилирования также показывает высокие показатели чувствительности и специфичности.

Таблица 9 – Результаты прогноза метастазирования по экспрессии белок-кодирующих генов и метилированию генов микроРНК

	<i>CA9</i>	<i>NDUFA4L2</i>	<i>EGLN3</i>	<i>BHLHE41</i>	Модель 1 0-M0 1-M1	<i>miR 125b-1</i>	<i>miR 137</i>	<i>miR 375</i>	<i>miR 193a</i>	<i>miR 34b/c</i>	Модель 2 0-M0 1-M1	Модель 3 0-M0 1-M1	Клин.данные 0-M0 1- M1
1	589	564	75,1	55,2	0	4,35	0,68	4,18	4,18	24,11	0	0	0
2	42,2	0,8	4,9	5	0	0,46	23,88	8,42	18,42	4,15	0	0	0
3	5,6	9,2	6,3	3,2	0	61,33	62,91	6,16	76,16	0,01	0	0	0
4	72	76,8	34,7	8,2	0	1,62	5,92	0,08	32,08	7,96	0	0	0
5	36,6	26,5	13,5	5,5	0	3,95	10	9,41	9,41	5,6	0	0	0
6	62,4	34,7	41,1	4,1	0	24,24	0,01	5,33	5,33	6,55	0	0	0
7	40	44,7	28,7	5,8	0	4,53	0,02	1,24	41,24	7,51	0	0	0
8	23,9	10,6	6,8	1,7	1	5,41	0,05	38,99	38,99	40,37	0	0	0
9	0,7	2	3,5	3,6	1	79,01	90	24,07	49,87	28,68	0	1	0
10	107	0,8	1,1	7,7	0	0,72	0,62	5,96	3,2	33,42	0	0	0
11	163	14,3	16,7	1,5	0	23,32	14,96	23,86	16,85	17,99	0	0	0
12	163	200,1	23,8	69,7	0	17,68	0,22	19,77	22,74	15,9	0	0	0
13	391	221,4	56,6	3,9	0	58,46	38,09	76,53	69,65	66,62	1	0	0
14	110	11,2	7,2	1,4	0	13,91	16,49	0,17	17,79	17,87	0	0	0
15	7,5	12,4	19,4	1,7	1	50,99	68,02	56,89	50,17	55,77	0	1	0
16	10,1	61,3	3,3	2,4	1	51,88	63,52	46,42	31,54	66,58	0	0	0
17	60,3	5,2	26,2	8,2	0	0,52	21,12	14,86	21,02	15,97	0	0	0
18	82,7	74,9	30,2	3,2	0	50,68	62,87	82,91	59,92	46,22	0	0	0
19	475	46,2	37,4	8,3	0	14,47	22,18	21,41	21,42	19,56	0	0	0
20	43,3	10,2	45	2,3	1	3,66	79,24	9,46	8,13	1,9	0	0	0

21	188	41,1	6,8	3,2	0	42,93	66,17	72,61	68,64	50,35	0	0	0
22	9,5	5,6	5,4	1	1	26,02	38,1	28,2	34,65	35,26	0	0	0
23	0,2	0,2	1,6	2,5	1	28,7	32,34	41,94	39,13	42,1	0	0	0
24	325	76	13,9	1,1	0	18,96	19,71	13,5	20,56	21,96	0	0	0
25	43,1	3,9	13,1	2,5	1	14,14	20,57	18,17	14,65	15,25	0	0	0
26	77,2	26,2	15,3	2,4	0	81,46	57,62	73,15	74,33	61,67	1	0	0
27	115	30,4	7,8	2,7	0	66,14	64,69	53,57	74,63	61,83	1	0	0
28	267	501,3	37,4	14,8	0	69,77	76,75	64,29	89,53	82	1	0	0
29	310	59,9	62,1	22,1	0	31,39	28,82	78,39	27,85	28,84	0	0	0
30	223	54	12,1	1,4	0	13,38	19,88	19,08	0,24	16,58	0	0	0
31	287	65	5,6	2,3	0	65,27	77,05	80,64	1,12	49,98	0	0	0
32	92,7	62,9	8	0,4	0	28,41	17,8	18,11	11,56	18,28	0	0	0
33	21,6	14,5	9,5	1,3	1	46,17	57,18	61,41	46,78	39,22	0	0	0
34	13,2	23,8	4,5	1,7	0	51,12	45,19	56,64	56,87	60,29	0	0	0
35	164	84,1	6,5	1,2	0	26,48	28,48	16,23	19,45	18,94	0	0	0
36	2	44,9	1	4	0	54,29	43,56	62,13	58,41	61,37	0	0	0
37	578	56,9	4,6	5,2	0	46,79	39,84	59,87	47,97	48,39	0	0	0
38	0,5	0,5	0,1	0,3	1	36,27	16,29	24,58	23,61	19,47	0	0	0
39	573	144,7	17,4	10,1	0	31,16	23,19	21,17	26,81	17,59	0	0	0
40	62,9	121,7	11,4	20	0	54,31	58,76	63,85	59,39	67,41	0	0	0

Продолжение таблицы 9

41	143	29,9	24,3	1,4	0	58,62	54,56	65,21	58,39	59,17	1	0	0
42	198	32,5	4,4	2,6	0	55,18	48,49	47,23	48,69	54,26	0	0	0
43	59,8	116,7	20,2	16	0	71,15	74,23	84,23	79,56	82,53	1	0	0
44	727	70,6	42,9	10,4	0	65,43	64,21	54,23	68,53	67,47	1	0	0
45	59,8	24,9	6,7	3,5	0	68,28	67,73	67,89	63,89	66,39	1	0	0
46	107	90,8	7,4	2,3	0	61,19	59,21	58,86	56,19	59,47	1	0	0
47	211	45,2	7,3	4,8	0	29,72	17,46	17,48	13,6	18,37	0	0	0
48	175	7,5	4,9	5,6	0	58,32	53,21	58,29	54,69	60,38	0	0	0
49	760	206,3	30,1	15,3	0	59,53	52,18	62,38	59,47	61,31	0	0	0
50	20,7	5,9	2,5	4,1	1	56,24	3,46	6,34	71,03	24,67	0	0	1
51	5,5	7,9	6,5	0,5	1	72,82	71,8	87,8	47,44	77,33	1	1	1
52	36,2	42,1	1,9	3,4	0	77,93	71,43	64,53	64,82	36,88	1	1	1
53	51,3	34	7,8	1,8	0	71,4	70,38	87,64	87,12	69,95	1	1	1
54	50,6	13,5	2,6	1,2	1	59,46	99,1	84,64	82,9	77,51	1	1	1
55	142	79,4	4,9	10,4	0	78,56	86,1	76,16	79,75	80,15	1	0	1
56	1,9	0,8	1,9	1,1	1	79,98	73,22	3,21	73,41	96,64	1	1	1
57	0,7	3,9	1,1	0,5	1	83,19	72,74	87,92	61,66	84,43	1	1	1
58	17,8	15,1	3,1	2,2	1	82,57	97,62	7	70,98	69,71	1	1	1
59	0,5	0,02	0,01	0,5	1	75,24	71,07	43,96	69,16	68,54	1	1	1
60	13,6	6,5	1,6	1,7	1	87,88	76,29	73,23	84,62	80,46	1	1	1

61	1,1	2	1,2	0,3	1	94,03	9,69	64,8	89,86	26,03	0	1	1
62	0,04	0,2	0,4	2,1	1	73,91	61,43	79,08	81,33	35,62	1	1	1
63	33,1	21,2	1,5	2,5	1	56,34	58,65	67,15	36,1	52,13	1	1	1
64	0,1	1,5	0,5	1,5	1	59,09	2,86	2,58	67,81	51,52	0	1	1
65	0,01	0,01	0,1	0,4	1	8,29	52,38	4,14	5,16	0,02	0	0	1
66	49	18,8	9,2	1,4	1	46,82	78,52	76,61	84,5	33,74	0	1	1
67	95,5	52,1	8,3	1,5	0	66,37	71,16	78,36	61,45	59,19	1	1	1
68	0,1	4,3	4,1	1,4	1	69,28	61,84	72,19	47,34	51,21	1	1	1
69	125	7,1	6,9	0,4	0	50,36	44,12	47,21	35,67	73,12	0	0	1
70	4,1	4,3	4,2	2,3	1	52,19	41,67	50,21	48,67	61,36	0	1	1
71	1,2	0,8	0,7	0,4	1	44,29	41,39	54,29	44,38	53,47	0	1	1
72	3	2,6	2,8	0,5	1	56,78	59,34	64,46	71,27	56,39	1	1	1
73	24	1	10,8	2,4	1	74,12	61,23	68,87	68,67	67,11	1	1	1
74	25	56,6	8,2	2,5	0	64,26	65,94	66,19	59,38	54,12	1	1	1
75	40,2	13,1	15,8	2,5	1	66,34	73,44	67,23	53,19	68,56	1	1	1
76	43,7	22	3	1,6	1	61,57	59,47	41,28	58,47	58,36	1	1	1
77	722	57,7	1,9	2,6	0	56,83	58,18	59,04	49,67	61,26	1	1	1
78	20,6	30,9	11,6	1,3	0	72,18	76,24	81,67	79,39	81,12	1	1	1
79	3,2	3,5	2,8	1,7	1	64,16	49,21	65,15	48,36	59,23	1	1	1
80	2,1	2,7	0,7	9,4	1	63,37	3,98	77,58	67,58	13,69	0	1	1

Представленные данные позволяют считать, что разработанная комбинированная панель обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Определенный нами уровень AUC 0,915 указывает на высокую точность при прогнозе развития метастазов, что является еще одним важным аргументом в пользу применения комбинированной панели при проведении молекулярно-генетического тестирования. Также следует отметить, что вероятность отсутствия метастазов при отрицательном тесте по всем маркерам, составляет 92%.

Таким образом, основываясь на уровнях экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE41*, *EGLN3* и особенностях метилирования генов микроРНК *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* с высокой вероятностью можно предсказать высокий метастатический потенциал светлоклеточного рака почки. Принцип метода основывается на рассчитанных пороговых значениях уровней метилирования и экспрессии генов. Для белок-кодирующих генов значение ниже или равное пороговому является маркером метастазирования. Для микроРНК-кодирующих генов маркером метастазирования является уровень метилирования выше порогового значения.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного нами исследования определен набор генов для прогноза развития метастазов скПКР. В основе оценки вероятности развития метастазов лежит изменение уровня экспрессии мРНК генов *CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* и/или метилирования генов микроРНК (*miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*) в опухоли.

Все четыре белок-кодирующих гена (*CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*) являются прямыми мишенями HIF1 (индуцируемый гипоксией фактор) [204,66,143,127]. Роль данного фактора имеет ключевое значение в патогенезе светлоклеточного рака почки и достаточно хорошо изучена. В условиях нормальной оксигенации и при отсутствии мутации в гене *VHL*, продукт этого гена - белок VHL - входит в состав E3 убиквитин-лигазного комплекса, который способствует присоединению убиквитина к гидроксированным транскрипционным факторам HIF, способствуя их деградации по протеосомному пути. В условиях гипоксии HIF1 α транслоцируется в ядро, где он димеризуется с конститутивно экспрессируемым фактором HIF1b, образуя комплекс HIF1. Накопление HIF1 α происходит также вследствие инактивации гена *VHL*. При гипоксии и/или отсутствии функционального продукта VHL, комплекс VHL не связывается с негидроксированными транскрипционными факторами HIF, приводя к их накоплению в клетках и образованию комплекса HIF1 [108,155]. Фактор HIF1 активирует транскрипцию ряда генов-мишеней, посредством связывания с участком ДНК, отвечающим за содержание кислорода в клетке - элементом ответа на гипоксию (HRE), расположенном в регуляторной области гена-мишени. Индукция экспрессии генов, активируемых гипоксией, необходима для клеточной адаптации к микроокружению с низким уровнем кислорода, например, при росте солидных опухолей и перехода регуляции гомеостаза на новый уровень [156].

Повышение уровня экспрессии выявленных нами генов, по-видимому, обусловлено опосредованными HIF1 процессами адаптации к микроокружению с

низким уровнем кислорода, а также вследствие накопления HIF1 α , вызванного инактивацией гена *VHL*. Однако, в ходе развития опухоли уровень их экспрессии снижается. Можно предположить, что по мере прогрессирования опухоли почки, процессы, связанные с сильным первоначальным ответом на гипоксию, обусловленные регулирующим действием HIF1 α , затухают. Вместе с тем, развиваются другие процессы, например, воспалительные.

Белок-кодирующие гены.

CAIX (карбоксиангидраза 9) - трансмембранный гликопротеин. Этот ферментный белок участвует в преобразовании углекислого газа в бикарбонат, транспорте ионов и контроле pH и является маркером гипоксии опухоли [167]. В ряде работ было показано, повышенная экспрессия этого белка при раке легких, молочной железы и опухолей головы и шеи, ассоциирована с агрессивностью опухолевого процесса [31]. Однако в отношении рака почки высокая экспрессия этого белка связана с лучшим прогнозом и была выше у пациентов с более низкими стадиями заболевания [168]. Специфичность CAIX, как биомаркера при светлоклеточном раке почки, приближается к 100%, так как у больных с доброкачественными опухолями и здоровых доноров экспрессия не выявляется. Повышенный уровень экспрессии CAIX ассоциирован с лучшими показателями БПВ и ОВ.

Экспрессия CAIX связана с pVHL и, регулируется транскрипционным фактором HIF-1 α [53,192]. Рядом авторов было показано, что снижение экспрессии CAIX происходит в опухолях с самым высоким потенциалом злокачественности [38]. Мета-анализ существующих исследований, проведенный Zhao Z. и др., показал, что низкий уровень экспрессии CAIX при скПКР коррелирует с высокой степенью злокачественности, наличием отдаленных метастазов и метастазов в лимфатические узлы. Также показана связь снижения уровня экспрессии с худшей канцер-специфической, беспрогрессивной и общей выживаемостью [206]. Снижение экспрессии гена CAIX у пациентов с плохим прогнозом, ряд исследователей связывают с активацией альтернативных сигнальных путей Akt - mTOR, что делает прогрессию опухоли, менее зависимой от гипоксии [53].

Снижение уровня экспрессии *CAIX*, соответственно полученным нами результатам, свидетельствует о повышенном метастатическом потенциале скПКР, что соответствует приведенным литературным данным.

Вторым белок-кодирующим геном, вошедшим в предложенную нами прогностическую панель метастазирования светлоклеточного рака почки, является ген *NDUFA4L2*. Продукт гена *NDUFA4L2* - субъединица NADH-дегидрогеназы, является компонентом дыхательной цепи митохондрий. *NDUFA4L2* также, как и ген *CAIX*, имеет выраженную зависимость экспрессии от гипоксии и является прямой мишенью гена *HIF1 α* . Функции *NDUFA4L2* мало изучены, но, вероятно, состоят в регуляции окислительного фосфорилирования через взаимодействие с другими субъединицами внутри комплекса I дыхательной цепи митохондрий. Активированный в условиях гипоксии *NDUFA4L2* ослабляет потребление кислорода митохондриями, путем ингибирования активности комплекса I, что ограничивает внутриклеточную выработку АФК в условиях низкого содержания кислорода [170]. Понижение экспрессии гена *NDUFA4L2* ассоциировано с нарушением молекулярного механизма перехода клеток к анаэробному гликолизу, что не позволяет снизить продукцию активных форм кислорода и способствует дальнейшей прогрессии [35]. Значение экспрессии *NDUFA4L2* для развития скПКР впервые было показано Апанович Н.В. и соавт [16], а в дальнейшем и в других работах [15,126,112,14]. В работе Meng et al. продемонстрирована высокая экспрессия *NDUFA4L2* в тканях и в клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) при культивировании в условиях гипоксии. При этом *NDUFA4L2*, активированный *HIF1 α* , подавлял продукцию АФК дыхательной цепью митохондрий в клетках НМРЛ. Нокдаун *NDUFA4L2* способствовал повышению продукции АФК, апоптозу и прогрессированию ЭМП в клеточных линиях НМРЛ [123]. По-видимому, активация ЭМП вследствие снижения уровня экспрессии *NDUFA4L2* является механизмом его влияния на метастазирование скПКР. В нашей работе было получено высоко достоверное различие уровней экспрессии *NDUFA4L2* у пациентов с метастазами и без метастазов. Медианы экспрессии составили 41,1 и

6,5 соответственно ($p=0.003$), что подтверждает значение данного гена в процессе метастазирования скПКР.

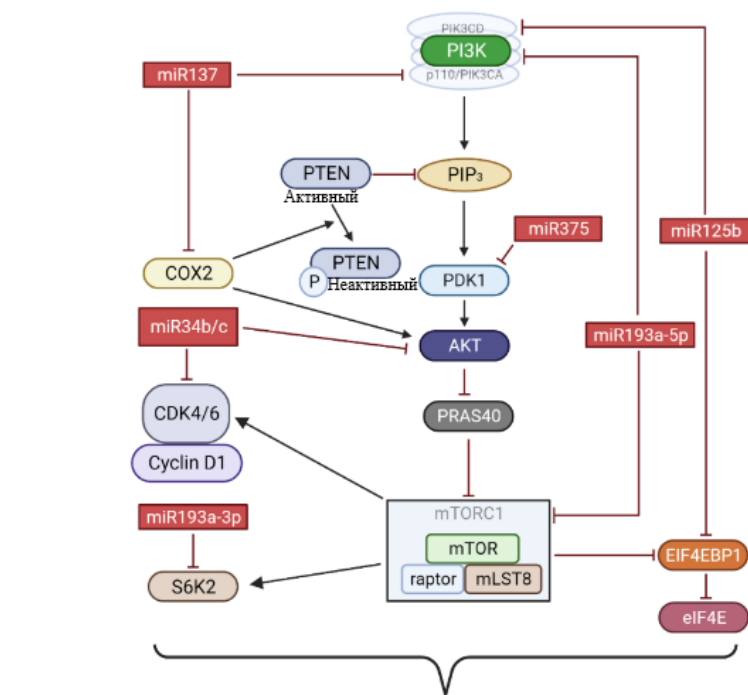
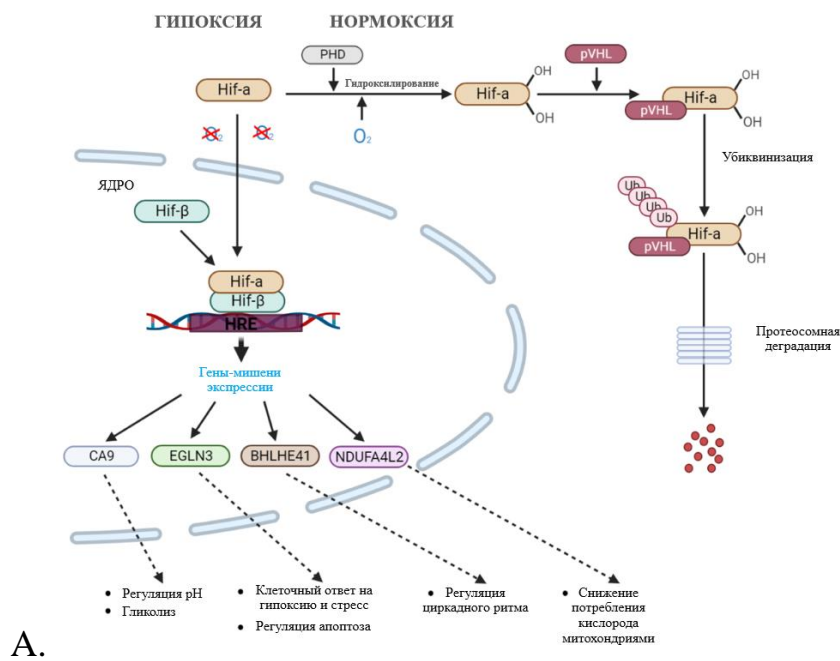
EGLN3 (PHD3) - пролилгидроксилаза 3, экспрессия которой является HIF1-зависимой и способствует предупреждению апоптоза в клетках в условиях гипоксического стресса. Существует также и обратная связь в этом сигнальном пути. При нормальных условиях PHD3 гидроксилирует HIF1 α , который затем связывается с pVHL, убиквитинируется и деградирует через протеосому. Также PHD3 гидроксилирует и активирует коактиватор HIF1A – PKM2 [116]. Соответственно, снижение экспрессии EGLN3 у больных скПКР приводит к накоплению HIF1 α , что в свою очередь приводит к экспрессии пула генов, отвечающих, за анаэробный метаболизм, ангиогенез, пролиферацию, и в целом выживаемость клетки.

Еще одной важной функцией PHD3 является участие в регуляции метаболизма глюкозы. Показано, что PHD3 регулирует ключевые гликолитические ферменты, включающие PFKF, TPI1, ENO1, PGAM1 и LDHA вместе с переносчиком глюкозы GLUT1. LDHA катализирует превращение пирувата в лактат. Таким образом, PHD3 поддерживает высокую скорость гликолиза и продукции лактата в скПКР [125]. LDHA сверхэкспрессируется при многих видах рака и играет решающую роль в пролиферации, инвазии и метастазировании опухоли [62]. Пониженный уровень экспрессии гена *EGLN3* ведет к нарушению гидроксилирования внеклеточной сигнал-регулируемой киназы 3 (Egk3) – одного из ключевых игроков, регулирующих прогрессию опухоли [169]. При скрининговых исследованиях была показана дифференциальная экспрессия *EGLN3* при скПКР [203, 211]. Также была выявлена связь экспрессии этого гена с общей выживаемостью [169] и прогрессированием [106] при раке почки. Таким образом, полученные нами данные показывают, что снижение экспрессии *EGLN3* ассоциировано с метастазированием скПКР соответствует полученным ранее результатам в других работах, а ген *EGLN3* может рассматриваться как кандидат в биомаркеры метастазирования у больных скПКР.

BHLHE41 (*DEC2*) - (basic helix-loop-helix (bHLH) - транскрипционный фактор, активируемый гипоксией [127]. В условиях гипоксии HIF-1 α индуцирует транскрипцию *BHLHE41*. BHLHE41 в свою очередь может блокировать гипоксический ответ, способствуя протеасомной деградации HIF-1 α [62]. Среди множества функций BHLHE41 - участие в клеточной дифференцировке, иммунном ответе, регуляции молекулярных часов и канцерогенезе [105]. Значительное повышение экспрессии BHLHE41 при раке почки наблюдали при анализе в рамках TCGA [27]. Значение повышенной экспрессии этого гена для прогрессирования заболевания в настоящее время недостаточно понятно, однако показано, что подавление его экспрессии в культивируемых клетках скПКР ведет к ингибированию пролиферации [160]. В другом исследовании наблюдали, что трансфекция *BHLHE41* в культивируемые раковые клетки приводила к увеличению их доли в S и G2 фазах, при этом в фазе G1 она снижалась [186]. Из вышесказанного следует, что повышенная экспрессия *BHLHE41* способна увеличивать пролиферативные свойства клеток опухоли на начальной стадии скПКР. В то же время, повышенная экспрессия *BHLHE41* способна тормозить дальнейшее развитие опухоли, так как подавляет инвазию опухолевых клеток, ЭМП и метастазирование, что было показано при различных типах рака [128,19,105]. Известные механизмы действия гена *BHLHE41* соответствуют найденной нами связи уровня экспрессии этого гена с метастазированием скПКР.

Таким образом, с теоретической точки зрения, выявление нами зависимости связи пониженной экспрессии вышеперечисленных генов с метастазированием позволяет судить о степени активации молекулярных механизмов опухолевой прогрессии в клетке.

Схематическое изображение путей взаимодействия генов и их регуляции при раке представлено на рисунке 6.



А. HIF1 регуляция экспрессии генов при гипоксии. Б. МикроРНК, регулирующие сигнальный путь PI3K/AKT [3]

Рисунок 6 - Схематическое изображение путей взаимодействия генов и их регуляции при раке.

Метилирование ДНК необходимо для нормального развития и регуляции транскрипции, но при раковых опухолях оно обычно изменяется в сторону

гиперметилирования. В нашем исследовании мы определили 5 генов микроРНК (*miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*), гиперметилирование которых связано с метастазированием скПКР. Повышенная частота метилирования этих генов может свидетельствовать об онкосупрессорной функции соответствующих микроРНК или об активации экспрессии мРНК генов, являющихся для них мишенями (онкогенов).

Роль *miR-125b* в прогрессии рака противоречива, она может действовать как супрессор опухоли или как онкоген в разных видах рака. МикроРНК *miR-125b* происходит от *miR-125b-1* и *miR-125b-2* и приводит к деградации мРНК-мишеней или ингибированию трансляции посредством связывания с 3'-нетранслируемыми областями (3'-UTR) мРНК-мишеней. *miR-125b* может способствовать передаче сигналов в различных сигнальных путях [184]. Свою онкосупрессорную функцию *miR-125b* может проявлять путем прямого взаимодействия с дельта-каталитической субъединицей фосфоинозитид-3-киназы (PIK3CD) и снижения ее экспрессии, что было показано на клеточной линии анапластического рака щитовидной железы. Сверхэкспрессия PIK3CD вызывает увеличение миграции и инвазии клеток при этом заболевании. Кроме того, экзогенная *miR-125b* снижала экспрессию PI3K, p-Akt и p-mTOR в клетках анапластического рака щитовидной железы [37]. При гепатоцеллюлярной карциноме *miR-125b* оказывала ингибирующее действие на ЭМП и связанные с ним признаки с помощью SMAD2 и SMAD4, которые являются преобразователями сигнала сигнального пути TGF β [210]. Повышенная экспрессия *miR-125b* ингибировала инвазию и миграцию клеток рака яичников и была связана со снижением экспрессии EIF4EBP1 (EIF4E-связывающий белок 1). *EIF4EBP1* - онкоген, играющий критическую роль в контроле синтеза белка, роста и выживания клеток, тем самым способствуя онкогенезу [101]. Для *miR-125b* показана прямая корреляция снижения ее уровня экспрессии с увеличением уровня метилирования гена при разных видах рака [43,206,65]. Согласно полученным нами результатам гиперметилирование *miR125B-1* в образцах скПКР с метастазами указывает на онкосупрессорные свойства этой микроРНК при раке почки.

Сверхэкспрессия *miR-137* в клетках ПКР резко подавляла пролиферацию, миграцию и инвазию клеток, а также индуцировала апоптоз клеток *in vitro* и подавление роста опухоли *in vivo*. Кроме того, показано, что *miR-137* также ингибировала активацию сигнального пути PI3K/АКТ в клеточных линиях рака почки [205]. Прямой мишенью *miR-137* в клетках ПКР является PIK3R3, участвующий в регуляции сигнального пути АКТ/mTOR. Путем подавления экспрессии PIK3R3 *miR-137* ингибировала миграцию и инвазию клеток ПКР [107]. Схожие результаты показаны при раке желудка. При этом заболевании *miR-137* подавляла активацию сигнального пути PI3K/АКТ посредством нацеливания на циклооксигеназу-2 (Cox-2), как *in vitro*, так и *in vivo* [48]. Гиперметилирование промотора *miR137* было показано в тканях рака желудка и ее подавление индуцировало активацию ее мишени Cdc42. Активация Cdc42 связана с инициацией и прогрессией рака [44]. Было показано, что *miR-137* непосредственно нацеливается на белок Snail и ингибирует ЭМП при раке яичников, что является ранним и критическим этапом метастазирования [61]. Экспрессия *miR137* была подавлена и коррелировала с гиперметилированием при раке почки [175]. Таким образом, полученные нами данные по связи гиперметилирования *miR137* с метастазированием опухоли соответствуют имеющимся литературным данным.

Сверхэкспрессия *miR-375* вызывала подавление миграции и инвазии, а также ингибировала пролиферацию путем индукции апоптоза в клеточной линии рака почки. Свое супрессивное действие *miR-375* проявляла путем ингибирования PDK1 и предотвращения фосфорилирования АКТ в клетках рака почки [182]. Схожие результаты были показаны на клетках рака поджелудочной железы. *miR-375* подавляла рост клеток и индуцировала апоптоз путем негативной регуляции экспрессии 3-фосфоинозитид-зависимой протеинкиназы 1 (PDK1) [209]. Активация *miR-375* ингибировала миграцию и инвазию клеток НМРЛ человека, путем прямого нацеливания на рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (ERBB2) [46]. Подавление экспрессии HER-2, под действием *miR-375* также находили при раке желудка [161]. Было также продемонстрировано, что

miR-375 подавляют рост, метастазирование и чувствительность к лекарственным препаратам клеток рака яичников [199]. Экспрессия *miR-375* была снижена в образцах с измененным метилированием при скПКР [175]. В нашей работе уровень метилирования *miR-375* у больных с метастазами был достоверно выше, по сравнению с пациентами с локализованным заболеванием, 66,19 и 38,99 соответственно, что подтверждает положение о том, что гиперметилирование *miR-375* ассоциировано с развитием метастазов скПКР.

Повышенная экспрессия *miR-193a-3p/5p* ингибировала миграцию, инвазию и ЭМП клеток НМРЛ *in vitro* и образование метастазов в легких *in vivo*. Кроме того, в исследовании было обнаружено, что ERBB4 и S6K2 являются прямыми мишенями *miR-193a-3p*, а PIK3R3 и mTOR прямыми мишенями *miR-193a-5p* при НМРЛ. Также показано, что *miR-193a-3p/5p* может инактивировать сигнальный путь АКТ/mTOR [201]. Экспрессия *miR-193a* ингибировала рост, онкогенность и чувствительность к облучению клеток медуллобластомы при повышенной экспрессии MYC, MAX, DCAF7 и STMN1, которые были идентифицированы как новые мишени *miR-193a* и могут способствовать ее противоопухолевому эффекту. Экспрессия *miR-193a* в клетках медуллобластомы вызывает широко распространенную репрессию экспрессии генов, которая включает гены, участвующие в передаче сигналов WNT-пути, передаче сигналов NOTCH, регуляторах клеточного цикла, репликации ДНК, а также в организации и модификации хроматина [26].

Показано, что продукт гена *miR-193A* - один из ключевых посттранскрипционных регуляторов экспрессии белка-7, адапторного белка рецептора фактора роста, который является одним из ключевых медиаторов, вовлеченных в рецепторную тирозинкиназную сигнализацию. Аберрантное повышение уровня GRB7 часто ассоциируется с прогрессированием злокачественных опухолевых заболеваний человека. Снижение экспрессии *miR-193a-3p* за счет гиперметилирования ДНК является динамическим процессом прогрессирования рака яичников [137]. Сывороточные уровни *miR-193a-3p* были

значительно повышены у пациентов с скПКР на I стадии заболевания, по сравнению с контролем без рака ($P < 0,01$) [185].

Члены семейства *miR-34* описаны в качестве супрессоров опухолей при различных видах карцином. При раке шейки матки экспрессия *miR-34b* была снижена и ее уровень был связан с повышенным злокачественным потенциалом. При этом сверхэкспрессия *miR-34b* сильно подавляла пролиферацию клеток и индуцировала апоптоз клеточных линий рака шейки матки [40]. Экспрессия *miR-34b* в тканях колоректальной аденокарциномы отрицательно коррелировала с экспрессией белков p-PI3K, p-AKT и mTOR. При этом *miR-34b* может ингибировать колоректальную аденокарциному регулируя сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [104]. Также показано, что *miR-34b/c* подавляет экспрессию CDK4/6 в клеточных линиях рака молочной железы [110]. Гиперметилирование CpG *miR-34b* подавляет *miR-34b* при раке предстательной железы. Антипролиферативные и антимиграционные/инвазивные эффекты *miR-34b* были частично обусловлены подавлением пути Akt и маркеров ЭМП. Также показано, что *miR-34b* ингибирует онкогенность как *in vitro*, так и *in vivo* [156]. Экспрессия *miR-34b/c* может подавляться при раке желудка посредством гиперметилирования *miR-34B/C*, а также при мутациях гена p53. *miR-34b/c* регулирует экспрессию генов, вовлеченных в p53 опосредованную сигнальную сеть, подавляя пролиферацию, миграцию и метастазирование [195]. *miR-34b/c* усиливала прикрепление раковых клеток и подавляла рост и инвазию клеток в модели рака легкого у мышей. Также, у пациентов с аденокарциномой легкого были лучшие показатели выживаемости с более высокими уровнями *miR-34a/b/c*, чем у пациентов с более низкими уровнями [93].

Согласно полученным нами результатам, гиперметилирование генов микроРНК *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* связано с метастатическим потенциалом опухоли. По литературным данным, метилирование этих генов ассоциировано со снижением экспрессии соответствующих микроРНК. Совместно, эти данные могут указывать на супрессорную функцию *miR125b-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193a*, и *miR34b/c* при

скПКР. Из данных, описанных в литературе, указанные микроРНК участвуют во многих сигнальных путях, и некоторые обладают свойствами как супрессоров, так и онкогенов. Общим для этих пяти микроРНК является их участие в регуляции сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Как известно, сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR часто активируется при раке почки и приводит к увеличению клеточного роста, пролиферации и метастазирования [140]. Этим можно объяснить однонаправленное действие гиперметилирования выявленных генов микроРНК на прогрессирование скПКР.

Таким образом, показанная нами корреляция пониженной экспрессии белок-кодирующих генов и метастазирования, а также гиперметилирование генов микроРНК и активация молекулярных механизмов опухолевой прогрессии в клетке. Предложенная нами панель генов позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью определить пациентов, опухоль которых обладает метастатическим потенциалом. При отрицательном тесте вероятность того, что метастазы отсутствуют, составляет 92%. Новизной предлагаемого нами подхода для прогнозирования метастазирования у больных раком почки является сочетание в одном исследовании анализа экспрессии и метилирования двух разных групп генов, белок-кодирующих и микроРНК. На сегодняшний день, нам не известны прогностические панели генов, построенные на данном принципе, что подчеркивает оригинальность предложенного подхода. При использовании такого методологического решения задействованы группы генов, реализующие свою функцию двумя независимыми путями. Это регистрируется как реализация пониженной экспрессии или повышенного метилирования в отдельных образцах, дополняя друг друга в качестве маркеров, что способствует повышению прогностической точности при тестировании.

ВЫВОДЫ

1. Изученные гены: белок-кодирующие *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* характеризуются повышенной экспрессией в ткани скПКР, гены микроРНК: *miR (1258, 34B/C, 107, 132, 125B-1, 137, 375, 193A, 203A)* характеризуются повышенным метилированием при скПКР.

2. Снижение уровня экспрессии четырех белок-кодирующих генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* и увеличение уровня метилирования генов *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* ассоциировано с метастазированием скПКР, а данные гены являются кандидатами в биомаркеры.

3. На основе определенных ROC-анализом пороговых значениях экспрессии и метилирования генов (*CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*, *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*) сформирована прогностическая модель метастазирования скПКР.

4. Разработана прогностическая панель генов, состоящая из четырех белок-кодирующих и пяти микроРНК кодирующих генов (*CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*, *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C*). Совмещение экспрессии и метилирования позволяет повысить точность прогноза вероятного метастазирования. Чувствительность и специфичность прогностической панели составила 87% и 96%, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для прогнозирования развития метастазов у больных светлоклеточным раком почки может быть рекомендован анализ профиля экспрессии выявленных 4 белок-кодирующих генов и 5 генов микроРНК методом ПЦР-РВ, что поможет решить вопрос о целесообразности проведения адъювантной терапии и определить частоту проведения контрольных обследований. Минимальное количество генов, показавших значимые значения, должно быть не менее шести.

2. Для проведения экспресс-тестирования рекомендуется использовать разработанную панель генов, что позволит оптимизировать выбор тактики лечения больного.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БК – Белок-кодирующий ген

БПВ – беспрогрессивная выживаемость

БРВ – выживаемость без рецидива

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИКТ – ингибиторы контрольных точек

ИМ – индекс метилирования

ИО – иммуноонкологические препараты

кМС-ПЦР – количественная метил-специфичная ПЦР с детекцией в реальном времени

КСВ – канцер-специфическая выживаемость

ЛДГ- лактатдегидрогеназа

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МРТ – магнитно-резонансная томография

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

НПВ – нижняя полая вена

ОВ – общая выживаемость

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК - рибонуклеиновая кислота

РНЭ – радикальная нефрэктомия

РП - резекция почки

скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак

ТКИ – тирозинкиназные ингибиторы

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

САIX – карбоксиандгидраза 9

GES – сигнатуры экспрессии генов

IMDC – международный консорциум данных метастатического рака почки

miR – гены микроРНК

MSKCC – модель мемориального онкологического центра Слоана и Кеттеринга

TCGA – атлас ракового генома

TNM – международная классификация стадий злокачественных новообразований

VHL - von Hippel-Lindau (синдром Хиппеля-Линдау)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апанович, Н.В. Совместное определение экспрессии и метилирования генов для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака / Н.В. Апанович, В.И. Логинов, П.В. Апанович и др. // Онкоурология. – 2018. – Т.14(4). – С.16-21.
2. Апанович, Н.В. Сходство и различие процессов метастазирования и дифференцировки рака почки по экспрессии генов. / Н.В. Апанович, А.В. Матвеев, П. В. Апанович и др. // Онкоурология. – 2021. – 17(4). – С.19-26.
3. Береснева, Е.В. Гиперметилированные гены микроРНК как потенциальные маркеры светлоклеточного рака почки / Е.В. Береснева, В.И. Логинов, Д.С. Ходырев и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. Т. 62(1). – С. 13-18.
4. Береснева, Е.В. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечно-клеточном раке; связь с прогрессией рака. / Е.В. Береснева, С.В. Рыков, Д.С. Ходырев и др. // Генетика. – 2013. – Т. 49(3). – С. 366-375.
5. Григорьев, С.Г. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач / С.Г. Григорьев, Ю.В. Лобзин, Н.В. Скрипченко // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 8(4). – С. 36-45.
6. Клинические рекомендации по раку почки. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Copenhagen. – 2018. ISBN 978-94-92671-01-1
7. Логинов, В.И. Идентификация новых генов микроРНК, гиперметилированных при раке молочной железы. / В.И. Логинов, А.М. Бурденный, И.В. Пронина и др. // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50(5). – С. 797-802.
8. Логинов, В.И., Метилирование генов микроРНК и онкогенез // В.И. Логинов, С.В. Рыков, М.В. Фридман, Э.А. Брага / Биохимия. – 2015. – Т. 80(2). – С. 184-203.

9. Рыков, С.В. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. С.В. Рыков, Д.С. Ходырев, И.В. Пронина и др. // Генетика. – 2013. – Т. 49(7). – С. 896-901.
10. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2020.
11. Apanovich, N. The Choice of Candidates in Survival Markers Based on Coordinated Gene Expression in Renal Cancer / N. Apanovich, P. Apanovich, D. Mansorunov et al. // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – V. 11. – 615787. doi: 10.3389/fonc.2021.615787. PMID: 34046336; PMCID: PMC8144703.
12. Apanovich, N. The Genes-Candidates for Prognostic Markers of Metastasis by Expression Level in Clear Cell Renal Cell Cancer / N. Apanovich, M. Peters, P. Apanovich et al. // *Diagnostics (Basel)*. – 2020. – V. 10(1). – P. 30. doi: 10.3390/diagnostics10010030. PMID: 31936274; PMCID: PMC7168144.
13. Apanovich, N. Expression Profiles of Genes-Potential Therapy Targets-and Their Relationship to Survival in Renal Cell Carcinoma / N. Apanovich, M. Peters, P. Apanovich et al. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – V. 478(1). – P. 14-17. doi: 10.1134/S1607672918010040. Epub 2018 Mar 14. PMID: 29536301.
14. Apanovich, N. The Genes - Candidates for Prognostic Markers of Metastasis by Expression Level in Clear Cell Renal Cell Cancer / N.Apanovich, M. Peters, P. Apanovich et al. // *Diagnostics*. – 2020. – V. 30. – P.13.
15. Apanovich, N. Molecular genetic diagnostics of clear cell renal cell carcinoma / N. Apanovich, M. Peters, A. Korotaeva et al. // *Cancer Urology*. – 2016. – V. 12(4). – P. 16-20.
16. Apanovich, N. The differential gene expression in clear cell renal cell carcinoma and biomarker development / N. Apanovich, S. Poyarkov, M. Peters et al. // *European Journal of Human Genetics*. – 2015. – V. 23, Suppl.1. – P. 446.
17. Arai, E. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis / E. Arai, Y. Kanai // *International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology*. – 2011. – V. 4. – P. 58-73.

18. Aran, D. Comprehensive Analysis of Normal Adjacent to Tumor Transcriptomes / D. Aran, R. Camarda, J. Odegaard et al. // *Nature Communications*. – 2017. – V. 8. – P. 1077.
19. Asanoma, K. Regulation of the Mechanism of TWIST1 Transcription by BHLHE40 and BHLHE41 in Cancer Cells / K. Asanoma, G. Liu, T. Yamane et al. // *Molecular and Cellular Biology*. 2015. – V. 35(24). – P. 4096-4109. doi: 10.1128/MCB.00678-15. Epub 2015 Sep 21. PMID: 26391953; PMCID: PMC4648814.
20. Athanazio, D.A. Classification of Renal Cell Tumors—Current concepts and use of ancillary tests: Recommendations of the Brazilian Society of Pathology / D.A. Athanazio, L.S. Amorim, I.W. da Cunha et al. // *Surgical and Experimental Pathology*. – 2021. – V. 4. – P. 4.
21. Baylin, S.B. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications / S.B. Baylin, P.A. Jones // *Nature Reviews Cancer*. –2011. – V. 11. – P. 726-734.
22. Beresneva, E.V. Methylation profile of group of miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their involvement in cancer progression / E.V. Beresneva, S.V. Rykov, D.S. Khodyrev et al. // *Russian Journal of Genetics*. – 2013. – V. 49. – P. 320-328. doi: 10.1134/S1022795413030034.
23. Berkers, J. A possible role for mi- croRNA-141 down-regulation in sunitinib resistant metastatic clear cell renal cell carcinoma through induction of epithelial- to-mesenchymal transition and hypoxia resistance / J. Berkers, O. Govaere, P. Wolter et al. // *Journal of Urology*. – 2013. – V. 189(5). – P.1930-1938.
24. Beuselinck, B. Prognostic impact of baseline serum C-reactive protein in patients with metastatic renalcell carcinoma (RCC) treated with sunitinib / B. Beuselinck, Y.A. Vano, S. Oudard et al. // *BJU International*. – 2014. – V. 114. – P. 81-89.
25. Beuselinck, B. Prognostic impact of baseline serum C-reactive protein in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) treated with sunitinib / B. Beuselinck, Y.A. Vano, S. Oudard et al. // *BJU International*. – 2014. – V. 114(1). – P. 81-89. doi: 10.1111/bju.12494. Epub 2014 Jan 15. PMID: 24215209.

26. Bharambe, H.S. Restoration of miR-193a expression is tumor-suppressive in MYC amplified Group 3 medulloblastoma / H.S. Bharambe, A. Joshi, K. Yogi et al. // *Acta Neuropathologica Communications*. – 2020. – V. 8. – P. 70.
27. Bigot, P. Functional characterization of the 12p12.1 renal cancer-susceptibility locus implicates BHLHE41 / P. Bigot, L.M. Colli, M.J. Machiela et al. // *Nature Communications*. – 2016. – V.7. – P.1-10.
28. Braga, E.A. Five hypermethylated microRNA genes as potential markers of ovarian cancer / E.A. Braga, V.I. Loginov, A.M. Burdennyi, E.A. Filippova, I.V.Pronina, S.V. Kurevlev et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – V. 164. – P. 351-355. doi: 10.1007/s10517-018-3988-y.
29. Braga, E.A. Molecular Mechanisms in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Role of miRNAs and Hypermethylated miRNA Genes in Crucial Oncogenic Pathways and Processes / E.A. Braga, M.V. Fridman, V.I. Loginov, A.A. Dmitriev, S.G. Morozov // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – V. 10. – P. 320. doi: 10.3389/fgene.2019.00320. PMID: 31110513; PMCID: PMC6499217.
30. Brannon, A.R. Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns / A.R. Brannon, A. Reddy, M. Seiler et al. // *Genetics of Cancer*. – 2010. – V. 1. – P. 152-163.
31. Bratu, O. Renal tumor biomarkers (Review) / O. Bratu, D. Mischianu, D. Marcu et al. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2021. – V. 22(5). – P. 1297. doi: 10.3892/etm.2021.10732. Epub 2021 Sep 14. PMID: 34630652; PMCID: PMC8461509.
32. Braun, D.A. Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma / D.A. Braun, Y. Hou, Z. Bakouny et al. // *Nature Medicine*. – 2020. – V. 26. – P. 909-918. DOI PubMed PMC.
33. Braun, D.A. Clinical validation of *PBRM1* alterations as a marker of immune checkpoint inhibitor response in renal cell carcinoma / D.A. Braun, Y. Ishii, A.M. Walsh et al. // *JAMA Oncology*. – 2019. – V. 5. – P.1631-1633. DOI PubMed PMC.

34. Brooks, S.A. ClearCode34: A Prognostic Risk Predictor for Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma / S.A. Brooks, A.R. Brannon, J.S. Parker et al. // *European Urology*. –2014. – V. 66. – P. 77-84.
35. Brown, J.A. Targeting cancer using KAT inhibitors to mimic lethal knockouts / J.A. Brown, E. Bourke, L.A. Eriksson et al. // *Biochemical Society Transactions*. – 2016. – V. 44. – P. 979-986. DOI: 10.1042/BST20160081.
36. Brown, L.C. Evaluation of tumor microenvironment and biomarkers of immune checkpoint inhibitor response in metastatic renal cell carcinoma / L.C. Brown, J. Zhu, K. Desai et al. // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2022. – V. 10(10). – e005249. doi: 10.1136/jitc-2022-005249. PMID: 36252996; PMCID: PMC9577926.
37. Bu, Q. MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD / Q. Bu, F. You, G. Pan et al. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – V. 88. – P. 443-448. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.090. Epub 2017 Jan 22. PMID: 28122310.
38. Bui, M.H.T. Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy / M.H.T. Bui, D. Seligson, K.R. Han et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2003. – V. 9. – P. 802-811.
39. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma // *Nature*. – 2013. – N 499. – P. 43-49. doi: 10.1038/nature12222.
40. Cao, Z. MiR-34b regulates cervical cancer cell proliferation and apoptosis / Z. Cao, G. Zhang, C. Xie, Y. Zhou // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. – 2019. – V. 47(1). – P. 2042-2047. doi: 10.1080/21691401.2019.1614013. PMID: 31119955.
41. Carlo, M.I. Genomic alterations and outcomes with VEGF-targeted therapy in patients with clear cell renal cell carcinoma / M.I. Carlo, B. Manley, S. Patil et al. // *Kidney Cancer*. – 2017. – V. 1. – P. 49-56. DOI PubMed PMC.
42. Chamie, K. Carbonic anhydrase-IX score is a novel biomarker that predicts recurrence and survival for high- risk, nonmetastatic renal cell carcinoma: Data from the

phase III ARISER clinical trial / K. Chamie, P. Klöpfer, P. Bevan et al. // *Urologic Oncology*. – 2015. – V. 33(5):204. – e25-33. DOI PubMed.

43. Chen, H. Hypermethylation-Associated Silencing of miR-125a and miR-125b: A Potential Marker in Colorectal Cancer / H. Chen, Z. Xu // *Disease Markers*. – 2015. – 2015:345080. DOI: 10.1155/2015/345080.

44. Chen, Q. miR-137 is frequently down-regulated in gastric cancer and is a negative regulator of Cdc42 / Q. Chen, X. Chen, M. Zhang et al. // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2011. – V. 56(7). – P. 2009-2016. doi: 10.1007/s10620-010-1536-3. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21221794.

45. Chen, X. miR-129-3p, as a diagnostic and prognostic biomarker for renal cell carcinoma, attenuates cell migration and invasion via downregulating multiple metastasis-related genes / X. Chen, A. Ruan, X. Wang et al. // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2014. – V.140(8). – P. 1295-1304.

46. Cheng, L. miRNA-375 regulates the cell survival and apoptosis of human non-small cell carcinoma by targeting HER2 / L. Cheng, B. Zhan, P. Luo, B. Wang // *Molecular Medicine Reports*. – 2017. – V. 15(3). – P.1387-1392. doi: 10.3892/mmr.2017.6112. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28098887.

47. Cheng, T. Differential mi- croRNA expression in renal cell carcinoma / T. Cheng, L. Wang, Y. Li et al. // *Oncology Letters*. – 2013. – V. 6(3). – P. 769-776.

48. Cheng, Y. miR-137 effects on gastric carcinogenesis are mediated by targeting Cox-2-activated PI3K/AKT signaling pathway / Y. Cheng, Y. Li, D. Liu et al. // *FEBS Letters*. – 2014. – V. 588(17). – P. 3274-3281. doi: 10.1016/j.febslet.2014.07.012. Epub 2014 Jul 23. PMID: 25064845.

49. Cheng, D.T. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology / D.T. Cheng, T.N. Mitchell, A. Zehir et al. // *Journal of Molecular Diagnostics*. – 2015. – V. 17. – P. 251-264.

50. Choueiri, T.K. Correlation of PD-L1 tumor expression and treatment outcomes in patients with renal cell carcinoma receiving sunitinib or pazopanib: results

from COMPARZ, a randomized controlled trial / T.K. Choueiri, D.J. Figueroa, A.P. Fay et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – V. 21. – P. 1071-1077.

51. Choueiri, T.K. Phase II and biomarker study of the dual MET/VEGFR2 inhibitor foretinib in patients with papillary renal cell carcinoma / T.K. Choueiri, U. Vaishampayan, J.E. Rosenberg et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – V. 31. – P. 181-186. DOI PubMed PMC .

52. Chow, T. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis / T. Chow, Y.M. Youssef, E. Lianidou et al. // *Clinical Biochemistry*. – 2010. – V. 43(1-2). – P. 150-158.

53. Courcier, J. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma, Implications for Disease Management / J. Courcier, A.de la Taille, M. Nourieh et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21(19). – P. 7146. DOI: 10.3390/ijms21197146.

54. Creighton, C.J. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma / C.J. Creighton, M. Morgan, P.H. Gunaratne et al. // *Nature*. – 2013. – V. 499. – P. 43-49.

55. Croce, C.M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer / C.M. Croce // *Nature Review Genetics*. – 2009. – V. 10(10). – P. 704-714.

56. Braun, D.A. Immunogenomic characterization of advanced clear cell renal cell carcinoma treated with PD-1 blockade / D.A. Braun, Y. Hou, Z. Bakouny et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – V. 38(15). – suppl. 5010-5010.

57. Dias, F. Plasma extracellular vesicle-derived TIMP-1 mRNA as a prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma: a pilot study / F. Dias, A. Lu, M. Morais // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – P. 4624.

58. Dias, F. Extracellular vesicles enriched in hsa- miR-301a-3p and hsa-miR-1293 dynamics in clear cell renal cell carcinoma patients: Potential biomarkers of metastatic disease / F. Dias, A.L. Teixeira, I. Nogueira et al. // *Cancers (Basel)*. – 2020. – V. 12(6). – P. 1450.

59. Dizman, N. Correlates of clinical benefit from immunotherapy and targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma: Comprehensive genomic and transcriptomic

analysis / N. Dizman, Y. Lyou, N. Salgia et al. // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. – 2020. – V. 8(2). – e000953.

60. Dmitriev, A.A. Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma / A.A. Dmitriev, E.E. Rudenko, A.V. Kudryavtseva, G.S. Krasnov, V.V. Gordiyuk, N.V. Melnikova // *Biomed Research International*. – 2014. – 735292. doi: 10.1155/2014/735292.

61. Dong, P. MiR-137 and MiR-34a Directly Target Snail and Inhibit EMT, Invasion and Sphere-Forming Ability of Ovarian Cancer Cells / P. Dong, Y. Xiong, H. Watari et al. // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2016. – 35. doi:10.1186/s13046-016-0415-y.

62. Doherty, J.R. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics / J.R. Doherty, J.L. Cleveland // *Journal of Clinical Investigation*. – 2013. – V. 123(9). – P. 3685-3692.

63. Escudier, B. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial / B. Escudier, T. Eisen, W.M. Stadler et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – V. 27. – P. 3312-3318.

64. Faragalla, H. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma / H. Faragalla, Y.M. Youssef, A. Scorilas et al. // *Journal of Molecular Diagnostic*. – 2012. – V. 14(4). – P. 385-392.

65. Ferracin, M. miR-125b targets erythropoietin and its receptor and their expression correlates with metastatic potential and ERBB2/HER2 expression / M. Ferracin, C. Bassi, M. Pedriali et al. // *Molecular Cancer*. – 2013. – V. 12(1). – P. 130. doi: 10.1186/1476-4598-12-130.

66. Fredlund, E. Transcriptional adaptation of neuroblastoma cells to hypoxia / E. Fredlund, M. Ovenberger, K. Borg et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2008. – V. 366(4). – P. 1054-1060.

67. Fu, Q. Tumor miR-125b predicts recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma after surgical resection / Q. Fu, Z. Liu, D. Pan et al. // *Cancer Science*. – 2014. – V. 105(11). – P. 1427-1434.

68. Gámez-Pozo, A. MicroRNA expression profiling of peripheral blood samples predicts resistance to first-line sunitinib in advanced renal cell carcinoma patients / A. Gámez-Pozo, L.M. Antón-Aparicio, C. Bayona et al. // *Neoplasia*. – 2012. – V. 14(12). – P. 1144-1152.
69. Gao, C. MiR-200c sensitizes clear-cell renal cell carcinoma cells to sorafenib and imatinib by targeting heme oxygenase-1 / C. Gao, F.H. Peng, L.K. Peng // *Neoplasma*. – 2014. – V. 61(6). – P. 680-689.
70. Gene Expression Profiling Interactive Analysis: <http://gepia2.cancer-pku.cn/>.
71. Gossage, L. Clinical and pathological impact of VHL, PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A, and JARID1c in clear cell renal cell carcinoma / L. Gossage, M. Murtaza, A.F. Slatter et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2014. – V. (1). – P. 38-51. doi: 10.1002/gcc.22116. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24166983.
72. Grabmaier, K. Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma / K. Grabmaier, M.C.A. de Weijert, G.W. Verhaegh et al. // *Oncogene*. – 2004. – V. 23(33). – P. 5624-5631. doi: 10.1038/sj.onc.1207764. PMID: 15184875.
73. Grimberg, J. A Simple and Efficient Non-Organic Procedure for the Isolation of Genomic DNA from Blood / J. Grimberg, S. Nawoschik, L. Belluscio et al. // *Nucleic Acids Research*. – 1989. – V.17(20). doi:10.1093/nar/17.20.8390.
74. Hakimi, A.A. Adverse outcomes in clear cell renal cell carcinoma with mutations of 3p21 epigenetic regulators BAP1 and SETD2: a report by MSKCC and the KIRC TCGA research network / A.A. Hakimi, I. Ostrovnaya, B. Reva et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – V.19(12). – P. 3259-3267.
75. Hakimi, A.A. Clinical and pathologic impact of select chromatin-modulating tumor suppressors in clear cell renal cell carcinoma / A.A. Hakimi, Y.B. Chen, J. Wren et L. // *European Urology*. – 2013. – V. 63(5). – P. 848-854. doi: 10.1016/j.eururo.2012.09.005. Epub 2012 Sep 27. PMID: 23036577; PMCID: PMC3615105.

76. Hakimi, A.A. Transcriptomic profiling of the tumor microenvironment reveals distinct subgroups of clear cell renal cell cancer: data from a randomized phase III trial / A.A. Hakimi, M.H. Voss, F. Kuo et al. // *Cancer Discovery*. – 2019. – V. 9. – P. 510-525. DOI PubMed PMC.

77. Hao, J.F. Identification of potential biomarkers for clear cell renal cell carcinoma based on microRNA-mRNA pathway relationships / J.F. Hao, K.M. Ren, J.X. Bai et al. // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. – 2014. – V. 10(7). – C167-C177.

78. Harada, K. Expression of epithelial–mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy / K. Harada, H. Miyake, Y. Kusuda et al. // *BJU International*. – 2012. – V. 110. – E1131-E1137. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11297>.

79. He, C. Demethylation of miR-10b plays a suppressive role in ccRCC cells / C. He, X. Zhao, H. Jiang et al. // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2015. – V. 8. – P. 10595-105604.

80. Heinzelmann, J. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma / J. Heinzelmann, B. Henning, J. Sanjmyatav et al. // *World Journal of Urology*. – 2011. – V. 29(3). – P. 367-373.

81. Heinzelmann, J. MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases / J. Heinzelmann, A. Unrein, U. Wickmann et al. // *Annals of Surgical Oncology*. – 2014. – V. 21(3). – P. 1046-1054.

82. Heng, D.Y. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study / D.Y. Heng, W. Xie, M.M. Regan et al. // *Lancet Oncology*. – 2013. – V. 14. – P. 141-148.

83. Heng, D.Y. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study / D.Y. Heng, W. Xie, M.M. Regan et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – V. 27. – P. 5794-5799.

84. Hildebrandt, M.A.T. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma / M.A.T. Hildebrandt, J. Gu, J. Lin et al. // *Oncogene*. – 2010. – V. 29. – 5724-5728.

85. Incorvaia, L. A “lymphocyte microRNA signature” as predictive biomarker of immunotherapy response and plasma PD-1/PD-L1 expression levels in patients with metastatic renal cell carcinoma: pointing towards epigenetic reprogramming / L. Incorvaia, D. Fanale, G. Badalamenti et al. // *Cancers (Basel)*. – 2020. – V. 12(11). – P. 3396.

86. Ivanova, N.A. The Role of Methylation of a Group of microRNA Genes in the Pathogenesis of Metastatic Renal Cell Carcinoma / N.A. Ivanova, A.M. Burdennyi, S.S. Lukina, E.A. Filippova, I.V. Pronina, A.V. Karpukhin, V.B. Matveev, T.P. Kazubskaya, V.I. Loginov, E.A. Braga, N.E. Kushlinskii // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2023. – V. 175(2). – P. 249-253. doi: 10.1007/s10517-023-05844-9. Epub 2023 Jul 19. PMID: 37466853.

87. Juan, D. Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer / D. Juan, G. Alexe, T. Antes et al. // *Urology* – 2010. – V. 75(4). – P. 835-841.

88. Kanai, Y. Genome-wide DNA methylation profiles in precancerous conditions and cancers / Y. Kanai // *Cancer Science*. – 2010. – V. 101. – P. 36-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891661>

89. Khella, H.W. Low expression of miR-126 is a prognostic marker for metastatic clear cell renal cell carcinoma / H.W. Khella, A. Scorilas, R. Mozes et al. // *American Journal of Pathology*. – 2015. – V. 185(3). – P. 693-703.

90. Khella, H.W. miR-192, miR-194 and miR-215: a convergent microRNA network suppressing tumor progression in renal cell carcinoma / H.W. Khella, M. Bakhet, G. Allo et al. // *Carcinogenesis*. – 2013. – V. 34(10). – P. 2231-2239.

91. Khella, H.W. Exploring the role of miRNAs in renal cell carcinoma progression and metastasis through bioinformatic and experimental analyses / H.W. Khella, N.M. White, H. Faragalla et al. // *Tumour Biology*. – 2012. – V. 33(1). – P. 131-140.

92. Kim, B.J. Prognostic and predictive value of VHL gene alteration in renal cell carcinoma: a meta-analysis and review / B.J. Kim, J.H. Kim, H.S. Kim, D.Y. Zang // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8(8). – P. 13979-13985. doi: 10.18632/oncotarget.14704. PMID:28103578; PMCID: PMC5355155.

93. Kim, J.S. MiR-34a and miR-34b/c have distinct effects on the suppression of lung adenocarcinomas / J.S. Kim, E.J. Kim, S. Lee et al. // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2019. – V. 51(1). – P. 1-10. doi: 10.1038/s12276-018-0203-1. PMID: 30700696; PMCID: PMC6353903.

94. Kovacova, J. MiR-376b-3p is associated with long-term response to sunitinib in metastatic renal cell carcinoma patients / J. Kovacova, J. Juracek, A. Poprach et al. // *Cancer Genomics Proteomics*. – 2019. – V. 16(5). – P. 353-359.

95. Kowalik, C.G. Profiling microRNA from nephrectomy and biopsy specimens: Predictors of progression and survival in clear cell renal cell carcinoma / C.G. Kowalik, D.A. Palmer, T.B. Sullivan et al. // *BJU International*. – 2017. – V. 120(3). – P. 428-440.

96. Kunej, T. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature / T. Kunej, I. Godnic, J. Ferdin et al. // *Mutation Research*. – 2011. – V. 717(1–2). – P. 77-84. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008. PMID: 21420983.

97. Kwiatkowski, D.J. Mutations in TSC1, TSC2, and MTOR are associated with response to rapalogs in patients with metastatic Renal Cell Carcinoma / D.J. Kwiatkowski, T.K. Choueiri, A.P. Fay et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – V. 22. – P. 2445-2452.

98. Labriola, M.K. Characterization of tumor mutation burden, PD-L1 and DNA repair genes to assess relationship to immune checkpoint inhibitors response in metastatic renal cell carcinoma / M.K. Labriola, J. Zhu, R. Gupta et al. // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* . – 2020. – V 8.

99. Laird, P.W. DNA methylation and cancer / P.W. Laird , R. Jaenisch // *Human Molecular Genetics* . – 1994. – V. 3. – Spec No. 1487-1495.

100. Lee, K.H. Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer / K.H. Lee, C. Lotterman, C. Karikari et al. // *Pancreatology*. – 2009. – V. 9(3). – P. 293-301. DOI: 10.1159/000186051. PMID: 19407485.

101. Lee, M. MicroRNAs 125a and 125b inhibit ovarian cancer cells through post-transcriptional inactivation of EIF4EBP1 / M. Lee, E.J. Kim, M.J. Jeon // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7(8). – P. 8726-8742. doi: 10.18632/oncotarget.6474. PMID: 26646586; PMCID: PMC4891000.

102. Lehmann, U. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling / U. Lehmann, I. Berg-Ribbe, L.U. Wingen et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2005. – V. 11(10). – P. 3654-3660. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2462.

103. Li, H.P. Silencing of miRNA-148a by hypermethylation activates the integrin-mediated signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma / H.P. Li, H.Y. Huang, Y.R. Lai et al. // *Oncotarget*. – 2014. – V. 5(17). – P. 7610-7624. DOI: 10.18632/oncotarget.2282. PMID: 25277193.

104. Li, Y. Expression and significance of miR-34 with PI3K, AKT and mTOR proteins in colorectal adenocarcinoma tissues / Y. Li, L. Jin, W. Rong et al. // *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. – 2022. – V. 68(9). – P. 57-62. doi: 10.14715/cmb/2022.68.9.9. PMID: 36905274.

105. Li, P. DEC2 suppresses tumor proliferation and metastasis by regulating ERK/NF- κ B pathway in gastric cancer / P. Li, Y.F. Jia, X.L. Ma et al. // *American Journal of Cancer Research*. – 2016. – V. 6(8). – P.1741-1757.

106. Lin, L. Circular RNA circ-EGLN3 promotes renal cell carcinoma proliferation and aggressiveness via miR-1299-mediated IRF7 activation / L. Lin, J. Cai // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2020. – V. 121(11). – P. 4377-4385. doi: 10.1002/jcb.29620. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31904147.

107. Lin, S. MicroRNA-137 suppresses cell migration and invasion in renal cell carcinoma by targeting PIK3R3 / S. Lin, T. Liu, H. Liu et al. // *International Journal of*

Clinical and Experimental Medicine. – 2016. – V. 9(4). – P. 7160-7167.
www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM0019312.

108. Linehan, W.M. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications / W.M. Linehan, C.J. Ricketts // Nature Reviews Urology. – 2019. – V. 16. – P. 539-552. DOI: [10.1038/s41585-019-0211-5](https://doi.org/10.1038/s41585-019-0211-5).

109. Linehan, W.M. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma / W.M. Linehan, P.T. Spellman, C.J. Ricketts et al. // New England Journal of Medicine. – 2016. – V. 374. – P. 135-145. DOI PubMed PMC .

110. Liu, X. The regulation and function of miR-21-FOXO3a-miR-34b/c signaling in breast cancer / X. Liu, J. Feng, L. Tang et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – V. 16(2). – P. 3148-3162. doi: 10.3390/ijms16023148. PMID: 25647415; PMCID: PMC4346885.

111. Liu, X.D. *PBRM1* loss defines a nonimmunogenic tumor phenotype associated with checkpoint inhibitor resistance in renal carcinoma / X.D. Liu, W. Kong, C.B. Peterson et al. // Nature Communications. – 2020. – V. 11. – P. 2135. DOI PubMed PMC.

112. Liu, L. *NDUFA4L2* expression predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma patients / L. Liu, G. Lan, L. Peng et al. // Renal Failure. – 2016. – V. 38(8). – P.1199-1205.

113. Loginov, V.I. Methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their diagnostic value / V.I. Loginov, E.V. Beresneva, T.P. Kazubskaya, E.A. Braga, A.V. Karpukhin // Cancer Urology. – 2020. – V. 13. – P. 27-33. doi: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33.

114. Loginov, V.I. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis / V.I. Loginov, I.V. Pronina, A.M. Burdenny, E.A. Filippova, T.P. Kazubskaya, D.N. Kushlinsky, D.O. Utkin, D.S. Khodyrev, N.E. Kushlinskii, A.A. Dmitriev, E.A. Braga // Gene. – 2018. – V. 662. – P. 28-36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29631007.

115. Long, X.R. Micro- RNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in hepatocellular carcinogenesis / X.R. Long, Y. He, C. Huang et al. // *International Journal of Oncology*. – 2014. – V. 44(6). – P. 1515-1522. DOI: 10.3892/ijo.2014.2373. PMID: 24714841.

116. Luo, W. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1 / W. Luo, H. Hu, R. Chang et al. // *Cell*. – 2011. – V. 145(5). – P. 732-744. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.054. PMID: 21620138.

117. Manola, J. International Kidney Cancer Working Group. Prognostic model for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma: results from the international kidney cancer working group / J. Manola, P. Royston, P. Elson et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2011. – V. 17(16). – P. 5443-5450. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0553. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21828239; PMCID: PMC3387987.

118. Marta, G.N. Prognostic value of systemic inflammatory biomarkers in patients with metastatic renal cell carcinoma / G.N. Marta, P.I. Velho, R.R.C. Bonadio et al. // *Pathology and Oncology Research*. – 2020. – V. 26. – P. 2489-2497. DOI PubMed.

119. McCormick, R.I. miR-210 is a target of hypoxia-inducible factors 1 and 2 in renal cancer, regulates ISCU and correlates with good prognosis / R.I. McCormick, C. Blick, J. Ragoussis et al. // *British Journal of Cancer*. – 2013. – V. 108(5). – P. 1133-1142.

120. McDermott, D.F. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma / D.F. McDermott, M.A. Huseni, M.B. Atkins et al. // *Nature Medicine*. – 2018. – V. 24. – P. 749-757. doi: 10.1038/s41591-018-0053-3. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].

121. MedCalc Statistical Software: Электронный ресурс. – URL: <https://www.medcalc.org/calc/> Ostend, Belgium. – 2023.

122. Mekhail, T.M. Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic

renal cell carcinoma / T.M. Mekhail, R.M. Abou-Jawde, G. Boumerhi et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – V. 23. – P. 832-841.

123. Meng, L. Mitochondrial NDUFA4L2 protein promotes the vitality of lung cancer cells by repressing oxidative stress / L. Meng, X. Yang, X. Xie et al. // *Thoracic Cancer*. – 2019. – V. 10(4). – P. 676-685.

124. Miao, D. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma / D. Miao, C.A. Margolis, W. Gao et al. // *Science*. – 2018. – V. 359. – P. 801-806.

125. Miikkulainen, P. HIF prolyl hydroxylase PHD3 regulates translational machinery and glucose metabolism in clear cell renal cell carcinoma / P. Miikkulainen, H. Högel, K. Rantanen, et al. // *Cancer & Metabolism*. – 2017. – V. 5(5). – P. 10.

126. Minton, D.R. Role of NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Alpha Subcomplex 4-Like 2 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma / D.R. Minton, L. Fu, N.P. Mongan et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – V. 22(11). – P. 2791-2801.

127. Miyazaki, K. Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes / K. Miyazaki, T. Kawamoto, K. Tanimoto et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277(49). – P. 47014-47021.

128. Montagner, M. SHARP1 suppresses breast cancer metastasis by promoting degradation of hypoxia-inducible factors / M. Montagner, E. Enzo, M. Forcato et al. // *Nature*. – 2012. – V. 487(7407). – P. 380-384. doi: 10.1038/nature11207. PMID: 22801492.

129. Moore, L.E. Von Hippel-Lindau (VHL) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors / Moore LE, Nickerson ML, Brennan P et al. // *PLoS Genetics*. – 2011. – V. 7(10). – e1002312. doi: 10.1371/journal.pgen.1002312. Epub 2011 Oct 13. PMID: 22022277; PMCID: PMC3192834.

130. Morris, M.R. The epigenetic landscape of renal cancer / M.R. Morris, F. Latif // *Nature Reviews Nephrology*. – 2017. – V. 13. – P. 47-60. doi: 10.1038/nrneph.2016.168.

131. Motzer, R.J. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma / R.J. Motzer, J. Bacik, B.A. Murphy et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2002. – V. 20. – P. 289-296.

132. Motzer, R.J. Biomarker analyses from the phase III CheckMate 214 trial of nivolumab plus ipilimumab (N+I) or sunitinib (S) in advanced renal cell carcinoma (aRCC) / R.J. Motzer, T.K. Choueiri, D.F. McDermott et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – V. 38. – P. 5009-5009.

133. Motzer, R.J. Avelumab plus axitinib versus sunitinib in advanced renal cell carcinoma: biomarker analysis of the phase 3 JAVELIN Renal 101 trial / R.J. Motzer, P.B. Robbins, T. Powles et al. // *Nature Medicine*. – 2020. – V. 26. – P. 1733-1741.

134. Nakada, C. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c / C. Nakada, K. Matsuura, Y. Tsukamoto et al. // *Journal of Pathology*. – 2008. – V. 216(4). – P. 418-427.

135. National Cancer Institute (2017). Surveillance, epidemiology, and end results program. In: National Comprehensive Cancer Network (ed.), NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Kidney Cancer v1. 2017. Bethesda, MD: National Cancer Institute, Surveillance Systems Branch.

136. Négrier, S. Prognostic factors of survival and rapid progression in 782 patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Français d'Immunothérapie / S. Négrier, B. Escudier, F. Gomez et al. // *Annals of Oncology*. – 2002. – V. 13. – P. 1460-1468.

137. Ngu, S.F. Methylation-associated silencing of miR-193a-3p promotes ovarian cancer aggressiveness by targeting GRB7 and MAPK/ERK pathways / S.F. Ngu K.K. Chan H. Yang et al. // *Theranostics*. – 2018. – V. 8(2). – P. 423-436. DOI: 10.7150/thno.22377.

138. Osanto, S. Genome-wide microRNA expression analysis of clear cell renal cell carcinoma by next generation deep sequencing / S. Osanto, Y. Qin, H.P. Buermans et al. // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7(6). – e38298.

139. Panda, A. Endogenous retrovirus expression is associated with response to immune checkpoint blockade in clear cell renal cell carcinoma / A. Panda, A.A. de Cubas, M. Stein et al. // *JCI Insight*. – 2018. – V. 3. – P. 121522.

140. Pantuck, A.J. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: Implications for molecular patient selection for targeted therapy / A.J. Pantuck, D.B. Seligson, T. Klatte et al. // *Cancer*. – 2007. – V. 109. – P. 2257-2267. doi: 10.1002/cncr.22677.

141. Peña, C. Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: results from sorafenib phase III Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial / C. Peña, C. Lathia, M. Shan et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – V. 16. – P. 4853-4863.

142. Peña-Llopis, S. Cooperation and antagonism among cancer genes: the renal cancer paradigm / S. Peña-Llopis, A. Christie, X.J. Xie et al. // *Cancer Research*. – 2013. – V. 73(14). – P. 4173-4179. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0360. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23832661; PMCID: PMC4051157.

143. Pescador, N. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene / N. Pescador, Y. Cuevas, S. Narajo et al. // *Biochemical Journal*. – 2005. – V. 390. – P.189-197.

144. Pignon, J. Association of human endogenous retrovirus (hERV) expression with clinical efficacy of PD-1 blockade in metastatic clear cell renal cell carcinoma (mccRCC) / J. Pignon, O. Jegede, S.A. Shukla et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – V. 37. – P. 4568.

145. Piletič, K. MicroRNA epigenetic signatures in human disease / K. Piletič, T. Kunej // *Archives of Toxicology*. – 2016. – V. 90(10). – P. 2405-2419. DOI: 10.1007/s00204-016-1815-7. PMID: 27557899.

146. Prior, C. Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma / C. Prior, J.L. Perez-Gracia, J. Garcia-Donas et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9(1). – e86263.

147. Pronina, I.V. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression / I.V. Pronina, V.I. Loginov,

A.M. Burdenny, M.V. Fridman, V.N. Senchenko, T.P. Kazubskaya, N.E. Kushlinskii, A.A. Dmitriev, E.A. Braga // *Gene*. – 2017. – V. 604. – P. 1-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018. Epub 2016 Dec 18. PMID: 27998789.

148. Qian, Y. Prognostic Cancer Gene Expression Signatures: Current Status and Challenges / Y. Qian, J. Daza, T. Itzel et al. // *Cells*. – 2021. – V. 10(3). – P. 648. <https://doi.org/10.3390/cells10030648>.

149. Ralla, B. miR-9-5p in nephrectomy specimens is a potential predictor of primary resistance to first-line treatment with tyrosine kinase inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma / B. Ralla, J. Busch, A. Flörcken et al. // *Cancers*. – 2018. – V. 10(9). – P. 321.

150. Ricketts, C.J. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma / C.J. Ricketts, A.A. De Cubas, H. Fan et al. // *Cell Reports*. – 2018. – V. 23(1). – P. 313-326.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.075. Erratum in: *Cell Rep*. 2018 Jun 19; 23(12):3698. PMID: 29617669; PMCID: PMC6075733.

151. Rini, B. Molecular correlates differentiate response to atezolizumab (atezo) + bevacizumab (bev) vs sunitinib (sun): Results from a phase III study (IMmotion151) in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC) / B. Rini, M. Huseni, M. Atkins et al. // *Annals of Oncology*. – 2018. – V. 29. – viii724-725.

152. Roldan-Romero, J.M. Spanish Oncology Genitourinary Group (SOGUG). PTEN expression and mutations in TSC1, TSC2 and MTOR are associated with response to rapalogs in patients with renal cell carcinoma / J.M. Roldan-Romero, B. Beuselinck, M. Santos et al. // *International Journal of Cancer*. – 2020. – V. 146. – P. 1435-1144.

153. Samaan, S. miR-210 is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma / S. Samaan, H.W. Khella, A. Girgis et al. // *Journal of Molecular Diagnostics*. – 2015. – V. 17(2). – P.136-144.

154. Samstein, R.M. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types / R.M. Samstein, C.H. Lee, A.N. Shoushtari et al. // *Nature Genetics*. – 2019. – V. 51. – P. 202-206.

155. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / G.L. Semenza // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – V. 3(10). – P. 721-732.
156. Semenza, G.L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations / G.L. Semenza // *Journal of Clinical Investigation*. – 2013. – V.123(9). – P. 3664-3671.
157. Serie, D.J. Clear Cell Type A and B Molecular Subtypes in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Tumor Heterogeneity and Aggressiveness / D.J. Serie, R.W. Joseph, J.C. Cheville et al. // *European Urology*. – 2017. – V. 71. – P. 979-985.
158. Sharma, S. Epigenetics in cancer / S. Sharma, T.K. Kelly, P.A. Jones // *Carcinogenesis*. – 2010. – V. 31. – P. 27-36.
159. Shen, M. Association between PD-L1 expression and the prognosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis / M. Shen, G. Chen, Q. Xie et al. // *Urology International*. – 2020. – V. 104. – P. 533-541.
160. Shen Z. Overexpression of BHLHE41, correlated with DNA hypomethylation in 3'UTR region, promotes the growth of human clear cell renal cell carcinoma / Z. Shen, L. Zhu, C. Zhang et al. // *Oncology Reports*. – 2019. – V. 41(4). – P. 2137-2147. DOI: 10.3892/or.2019.7004.
161. Shen, Z.Y. miR-375 inhibits the proliferation of gastric cancer cells by repressing ERBB2 expression / Z.Y. Shen, Z.Z. Zhang, H. Liu et al. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2014. – V. 7(6). – P. 1757-1761. doi: 10.3892/etm.2014.1627. Epub 2014 Mar 20. PMID: 24926380; PMCID: PMC4043572.
162. Shinmei, S. MicroRNA-155 is a pre- dictive marker for survival in patients with clear cell renal cell carcinoma / S. Shinmei, N. Sakamoto, K. Goto et al. // *International Journal of Urology*. – 2013. – V. 20(5). – P. 468-477.
163. Singer, E.A. Targeted Therapeutic Strategies for the Management of Renal Cell Carcinoma / E.A. Singer, G.N. Gupta, R. Srinivasan // *Current Opinion in Oncology*. – 2012. – V. 24(3). – P. 284-290.

164. Slaby, O. Expression of miRNA- 106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy / O. Slaby, J. Jancovicova, R. Lakomy et al. // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2010. – V. 29(1). – P. 90.

165. Slaby, O. Identification of mi- croRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients / O. Slaby, M. Redova, A. Poprach et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2012. – V. 51(7). – P. 707-716.

166. Sun, J. Clinical significance of promoter region hyperme- thylation of microRNA-148a in gastroin- testinal cancers / J. Sun, Y. Song, Z. Wang et al. // *Onco Targets Therapy*. – 2014. – V. 7. – P. 853-863. DOI: 10.2147/ OTT.S60888. PMID: 24920927.

167. Svastova, E. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH / E. Svastova, A. Hulikova, M. Rafajova et al. // *FEBS Letters*. – 2004. – V. 577. – P. 439-445. doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.043.

168. Takacova, M. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma / M. Takacova, M. Bartosova, L. Skvarkova et al. // *Oncology Letters*. – 2013. – V. 5(1). – P. 191-197. doi: 10.3892/ol.2012.1001. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23255918; PMCID: PMC3525455.

169. Tamukong, P.K. Hypoxia-inducible factor pathway genes predict survival in metastatic clear cell renal cell carcinoma / P.K. Tamukong, P. Kuhlmann, S. You et al. // *Urologic Oncology*. – 2022. – V. 40(11). – 495.e1-495.e10. doi: 10.1016/j.urolonc.2022.07.010. Epub 2022 Aug 13. PMID: 35973929.

170. Tello, D. Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity / D. Tello, E. Balsa, B. Acosta-Iborra et al. // *Cell Metabolism*. – 2011. – V. 14(6). – P. 768-779.

171. Thompson, R.H. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target / R.H. Thompson, M.D. Gillett, J.C. Cheville et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – V. 101. – P. 17174-17179.

172. Tornberg, S.V. Serum tumour associated trypsin inhibitor, as a biomarker for survival in renal cell carcinoma / S.V. Tornberg, H. Nisen, P. Järvinen et al. // *Scandinavian Journal of Urology*. – 2020. – V. 54. – P. 413-419.
173. Tsai, H.C. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine / H.C. Tsai, S.B. Baylin // *Cell Research*. – 2011 – V. 21. – P. 502-517.
174. Ujfaludi, Z. Novel Diagnostic Value of Driver Gene Transcription Signatures to Characterise Clear Cell Renal Cell Carcinoma, CcRCC / Z. Ujfaludi, L. Kuthi, G. Pankotai-Bodó et al. // *Pathology and Oncology Research*. – 2022. – V. 28. – P. 1610345.
175. Varachev, V. Hypermethylated tumor suppressor microRNAs as novel markers of clear cell renal cell carcinoma / V. Varachev, V. Loginov, I. Pronina et al. // *FEBS Open Biology*. – 2018. – V. 8. – P. 304-305.
176. Vergho, D. Combination of expression levels of miR-21 and miR-126 is associated with cancer-specific survival in clear-cell renal cell carcinoma / D. Vergho, S. Kneitz, A. Rosenwald et al. // *BMC Cancer*. – 2014. – V. 14(1). – P. 25.
177. Vergho, D.C. Impact of miR-21, miR-126 and miR-221 as prognostic factors of clear cell renal cell carcinoma with tumor thrombus of the inferior vena cava / D.C. Vergho, S. Kneitz, C. Kalogirou et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9(10). – e109877.
178. Voss, M.H. Tumor genetic analyses of patients with metastatic renal cell carcinoma and extended benefit from mTOR inhibitor therapy / M.H. Voss, A.A. Hakimi, C.G. Pham et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – V. 20. – P. 1955-1964.
179. Voss, M.H. Genomically annotated risk model for advanced renal-cell carcinoma: a retrospective cohort study / M.H. Voss, A. Reising, Y. Cheng et al. // *Lancet Oncology*. – 2018. – V.19(12). – P. 1688-1698. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30648-X. Epub 2018 Nov 8. PMID: 30416077; PMCID: PMC6701184.
180. Vrba, L. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer / L. Vrba, J.L. Muñoz-Rodríguez, M.R. Stampfer et al. // *PLoS One*. – 2013. – V.8(1). – e54398. DOI: 10.1371/journal.pone.0054398. PMID: 23342147.

181. Wang, G. Overexpression of microRNA-100 predicts an unfavorable prognosis in renal cell carcinoma / G. Wang, L. Chen, J. Meng et al. // *International Urology and Nephrology*. – 2013. – V. 45(2). – P. 373-379.

182. Wang, J. MicroRNA-375 inhibits the proliferation, migration and invasion of kidney cancer cells by triggering apoptosis and modulation of PDK1 expression / J. Wang, X. Sun // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2018. – V. 62. – P. 227-233. doi: 10.1016/j.etap.2018.08.002. Epub 2018 Aug 2. PMID: 30098579.

183. Wang, M. Bottom-up and top-down paradigms of artificial intelligence research approaches to healthcare data science using growing real-world big data / M. Wang, M. Sushil, B.Y. Miao et al. // *Journal of the American Medical Informatics Association*. – 2023. – V. 30(7). – P. 1323-1332. doi: 10.1093/jamia/ocad085. PMID: 37187158; PMCID: PMC10280344.

184. Wang, Y. The Emerging Roles of miR-125b in Cancers / Y. Wang, G. Zeng, Y. Jiang // *Cancer Management and Research*. – 2020. – V. 12. – P. 1079-1088. doi: 10.2147/CMAR.S232388. PMID: 32104088; PMCID: PMC7024862.

185. Wang, C. A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma / C. Wang, J. Hu, M. Lu et al. // *Science Reports* 5, N 7610 (<https://doi.org/10.1038/srep07610>).

186. Wang, C. BHLHE41 promotes U87 and U251 cell proliferation via ERK/cyclinD1 signaling pathway / C. Wang, N. Zhao, Q. Zheng et al. // *Cancer Management and Research*. 2019. – V. 11. – P. 7657-7672.

187. Weaver, C. Diagnostic and prognostic biomarkers in renal clear cell carcinoma / C. Weaver, K.B. Satter, K.P. Richardson et al. // *Biomedicines*. – 2022. – V.10.(11). – P. 2953.

188. Wood, M.A. Burden of tumor mutations, neoepitopes, and other variants are weak predictors of cancer immunotherapy response and overall survival / M.A. Wood, B.R. Weeder, J.K. David et al. // *Genome Medicine*. – 2020. – V. 12. – P. 33.

189. Wotschovsky, Z. Diagnostic and prognostic potential of differentially expressed miRNAs between metastatic and non-metastatic renal cell carcinoma at the

time of nephrectomy / Z. Wotschovsky, J. Busch, M. Jung et al. // *Clinica Chimica Acta*. – 2013. – V. 416. – P. 5-10.

190. Wu, P. New Progress of Epigenetic Biomarkers in Urological / P. Wu, Z. Cao, S. Wu // *Cancer Disease Markers*. – 2016. – V. 28. – P. 1-8.

191. Wu, X. Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis / X. Wu, L. Weng, X. Li et al. // *PLoS ONE*. – 2012. – V.7(5). – e35661.

192. Wykoff, C.C. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases / C.C. Wykoff, N.J. Beasley, P.H. Watson, et al. // *Cancer Research*. – 2000. – V. 60. – P. 7075-7083.

193. Xiao, C.T. MicroRNA derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for diagnosing renal cell carcinoma / Xiao C T, Lai W J, W.A. Zhu et al. // *Onco Targets and Therapy*. – 2020. – V. 13. – P. 10765-10774.

194. Xing, T. Epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: mechanisms and potential use in molecular pathology / T. Xing, H. He // *Chinese Journal of Cancer Research*. – 2016. – V. 28. – P. 80-91. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.09

195. Xiong, S. Role of miR-34 in gastric cancer: From bench to bedside (Review) / S. Xiong, M. Hu, C. Li et al. // *Oncology Reports*. – 2019. – V. 42. – P. 1635-1646.

196. Xu, M. miR-203 inhibition of renal cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting of FGF2 / M. Xu, M. Gu, K. Zhang et al. // *Diagnostic Pathology*. – 2015. – V. 10. – P. 24. doi: 10.1186/s13000-015-0255-7.

197. Yang, C. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1 / C. Yang, J. Cai, Q. Wang et al. // *Gynecologic Oncology*. – 2012. – V. 124(2). – P. 325-334. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.10.013. PMID: 22005523.

198. Yang, L. A Review of Recent Research on the Role of MicroRNAs in Renal Cancer / L. Yang, X. Zou, J. Zou et al. // *Medical Science Monitor*. – 2021. – V. 27. – e930639. doi: 10.12659/MSM.930639. PMID: 33963171; PMCID: PMC8114846.

199. Yang, S. MicroRNA-375 inhibits the growth, drug sensitivity and metastasis of human ovarian cancer cells by targeting PAX2 / S. Yang, R. Yang, R. Lin et al. // JBUON. – 2019. – V. 24. – P. 2341-2346.
200. Yi, Z. Differential expression of miRNA patterns in renal cell carcinoma and nontumorous tissues / Z. Yi, Y. Fu, S. Zhao et al. // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2010. – V. 136(6). – P. 855-862.
201. Yu, T. MicroRNA-193a-3p and -5p suppress the metastasis of human non-small-cell lung cancer by downregulating the ERBB4/PIK3R3/mTOR/S6K2 signaling pathway / T. Yu, J. Li, M. Yan et al. // Oncogene. – 2015. – V. 34. – P. 413-423.
202. Zaman, M.S. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival / M.S. Zaman, V. Shahryari, G. Deng et al. // PLoS ONE. – 2012. – V. 7(2). – e31060.
203. Zaravinos, A. Altered metabolic pathways in clear cell renal cell carcinoma: A meta-analysis and validation study focused on the deregulated genes and their associated networks / A. Zaravinos, M. Pieri, N. Mourmouras et al. // Oncoscience. – 2014. – V.1(2). – P.117-131.
204. Zatovicova, M. Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain / M. Zatovicova, L. Jelenska, A. Hulikova et al. // Current Pharmaceutical Design. – 2010. – V.16(29). – P. 3255-3263.
205. Zhang, H. miR-137 inhibits renal cell carcinoma growth *in vitro* and *in vivo* / H. Zhang, H. Li // Oncology Letters. – 2016. – V. 12(1). – P. 715-720. doi: 10.3892/ol.2016.4616. Epub 2016 May 24. PMID: 27347205; PMCID: PMC4907286.
206. Zhang, Y. miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer / Y. Zhang, L.X. Yan, Q.N. Wu et al. // Cancer Research. – 2011. – V. 71(10). – P. 3552-3562. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2435. Epub 2011 Mar 28. PMID: 21444677.
207. Zhao, Z. Prognostic Value of Carbonic Anhydrase IX Immunohistochemical Expression in Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis of the Literature / Z. Zhao, G. Liao, Y. Li et al. // PLoS ONE. – 2014. – V.9(11). – e114096.

208. Zheng, B. MiRNA-30a-mediated autophagy inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to sorafenib / B. Zheng, H. Zhu, D. Gu et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – V. 459(2). – P. 234-239.

209. Zhou, J. MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway / J. Zhou, S. Song, S. He et al. // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2014. – V. 33(4). – P. 950-956. doi: 10.3892/ijmm.2014.1638. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24481267.

210. Zhou, J.N. MicroRNA-125b attenuates epithelial-mesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4 / J.N. Zhou, Q. Zeng, H.Y. Wang et al. // *Hepatology*. – 2015. – V. 62(3). – P. 801-815. doi: 10.1002/hep.27887. Epub 2015 Jul 3. PMID: 25953743.

211. Zodro, E. FUT11 as a potential biomarker of clear cell renal cell carcinoma progression based on meta-analysis of gene expression data / E. Zodro, M. Jaroszewski, A. Ida et al. // *Tumor Biology*. – 2014. – V. 35. – P. 2607-2617.