

МАТВЕЕВ АЛЕКСЕЙ ВСЕВОЛОДОВИЧ

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Стилиди Иван Сократович)

Научный руководитель:

Кононец Павел Вячеславович – доктор медицинских наук, директор НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделением торакальной онкологии, отделением абдоминальной онкологии №1.

Официальные оппоненты:

Шпоть Евгений Валерьевич, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе, профессор НИИ урологии и репродуктивного здоровья человека федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Калпинский Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, заведующий хирургическим отделом Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена — филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «07» ноября 2024 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01 (Д 001.017.01), созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан « ___ » _____ 202__ года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак почки представляет важную медицинскую проблему в связи со значительным ростом заболеваемости. 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 неметастатического светлоклеточного рака почки метастазы возникают в 5–15% случаев в течение пяти лет наблюдения, что существенно влияет на выживаемость пациентов. 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.

Регуляторные особенности гиперметилирования генов *VHL*, *RASSF1A*, *CDH1*, *APAF1* изучались многими исследователями в качестве биомаркеров светлоклеточного рака почки. 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%), *BAP1* (8–15%), и *PBRM1* (21–41%). 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). Роль экспрессии *miR-203* в метастазировании у больных скПКР подтверждена в ряде исследований.

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.

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.

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.

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

Теоретическая значимость работы заключается в получении доказательств связи уровней экспрессии белок-кодирующих генов и метилирования генов микроРНК с развитием метастазов у больных скПКР.

Полученные в исследовании данные имеют огромное практическое значение, поскольку на их основании могут быть индивидуализированы современные подходы к адъювантному лечению, определены алгоритмы наблюдения с целью выявления раннего рецидива заболевания, а также улучшению понимания молекулярных путей для целевых терапевтических воздействий.

Использование в теоретической и практической онкоурологии полученных результатов, позволит повысить квалификацию практических врачей в данной области.

Личный вклад

Автор самостоятельно провел тщательный анализ научной литературы, изучил степень разработанности проблемы, на основании чего были сформулированы цель и задачи исследования.

Соискатель самостоятельно разработал дизайн исследования, осуществлял сбор и статистический анализ архивных данных. Обработка, анализ и оценка результатов всех исследований, указанных в диссертации, проведены лично А.В. Матвеевым. Соискателем подготовлены полученные результаты к публикации.

Соответствие паспорту 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.).

Положения, выносимые на защиту

1. Изученный набор белок-кодирующих генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* характеризуется 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. 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*, *NDUFA4L2*, *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 четырех и более 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 шести и более 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.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования Матвеева Алексея Всеволодовича внедрены в лечебно-диагностическую работу отделения онкоурологии НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (акт внедрения от 02.07.2024г) и используются учебном процессе на кафедре последипломного образования врачей департамента профессионального образования ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 14 августа 2024 года на совместной научной конференции 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.

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

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.

Объём и структура работы

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.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

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 2023г. Исследование проводилось совместно с лабораторией молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова». Мужчин включено в исследование 46 (57,5%), женщин - 34 (42,5%).

Критериями включения больных в исследование являлись:

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.

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. академика Н.П. Бочкова (№ 2017 - 4/2). После забора ткань сразу замораживалась и хранилась при температуре -70°C . Медиана возраста составила от 38 до 79 лет и в среднем была 62 года.

У всех больных был диагностирован скПКР и подтвержден согласно гистологическому заключению. В таблице 1 представлено распределение больных скПКР в соответствии с классификацией pTNM.

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

В зависимости от наличия метастазов на момент исследования больные были разделены на 2 группы. Первая – составила 31 (38,75%) пациентов, у которых на момент исследования уже имелись отдаленные метастазы. Вторая – 49 (61,25%) пациентов, у которых не было отдаленных метастазов на момент исследования.

Выделение высокомолекулярной ДНК. ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции согласно стандартному протоколу.

Выделение суммарной РНК. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Выделение производили согласно инструкции к набору. Качество выделенной РНК проверяли при помощи электрофоретического разделения в 1,8% агарозном геле. Концентрацию РНК в водном растворе оценивали спектрофотометрически.

Анализ экспрессии генов. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора ImProm-II™ Reverse Transcription System (США). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) осуществляли с использованием наборов компании Applied Biosystems, США: TaqMan® Gene Expression Master Mix и TaqMan® Gene Expression Assay, специально разработанного для каждого анализируемого гена (GAPDH, CA9, NDUFA4L2, EGLN3 и VHLN41). 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 той же почки проводили с использованием программного обеспечения QuantStudio™ Design & Analysis Software методом $\Delta\Delta C_t$ (RQ).

Анализ метилирования генов микроРНК. Уровень метилирования генов микроРНК анализировали методом количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (qMC-ПЦР) по методу, опубликованному в работе. Амплификацию проводили с использованием набора реактивов «qPCRmix-HS SYBR» согласно протоколу фирмы Евроген в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса АСТВ с использованием олигонуклеотидов специфичных к неконвертированной матрице. 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”).

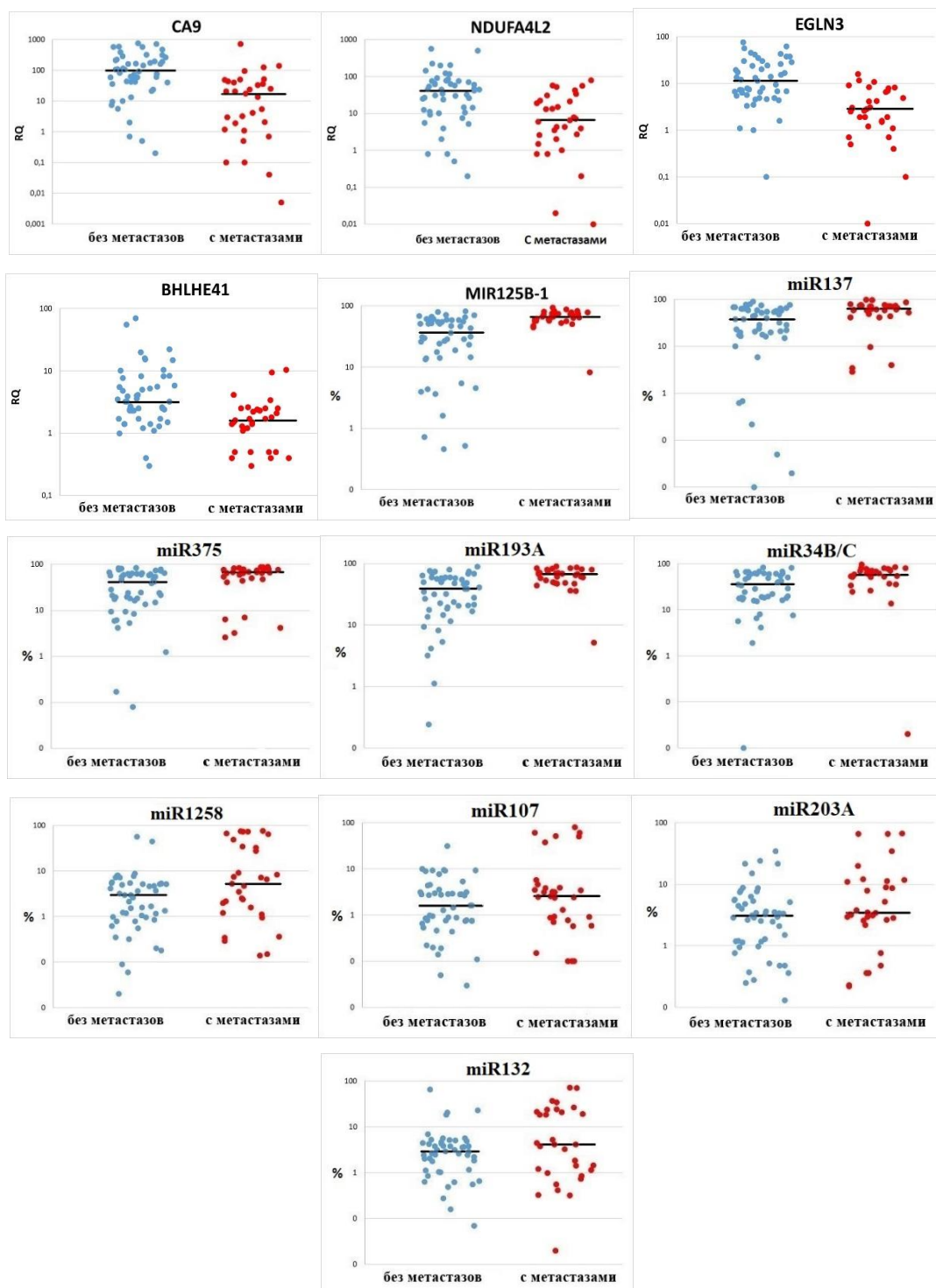
Статистическую оценку полученных данных по изменению уровня метилирования генов микроРНК проводили с применением показателя индекса метилирования (ИМ), рассчитанного для каждого образца. Количественные значения метилирования исследованных маркеров дихотомизировали путем установки порогового значения уровня метилирования. Порог был установлен, чтобы снизить уровень ложноположительных результатов. Пороговый уровень = $N(\text{mean}) + 2SD$, где SD – стандартное отклонение, $N(\text{mean})$ – средний уровень метилирования в норме (доноры).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «IBM SPSS Statistics 22» и MedCalc (MedCalc Software Ltd., Бельгия) Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Для поиска корреляции с метастазированием использовали тест Манна-Уитни (U-test). 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. Оптимальные системы маркеров выбирали по результатам ROC-анализа, проведенного с использованием программы MedCalc. Наборы маркеров оценивали по величинам чувствительности, специфичности и по площади под кривой (AUC, area under curve) на ROC-кривых. При выборе генов для прогностической панели приемлемым считали значение $AUC > 0.7$.

Результаты исследования

В 80 парных образцах ткани двух групп 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 1 и в таблице 2.



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

Рисунок 1 - 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 2).

Таблица 2 - 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 3).

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.

Таблица 3 - 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

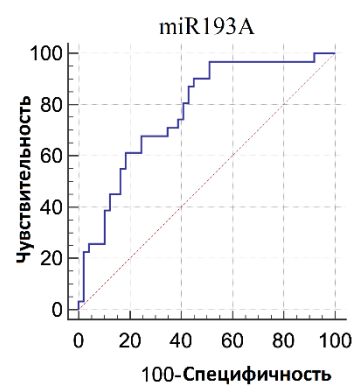
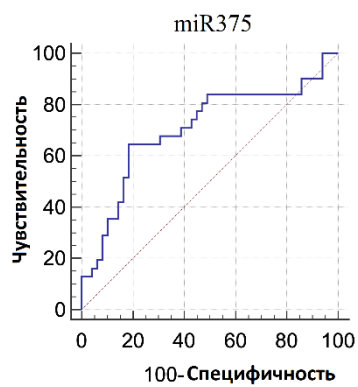
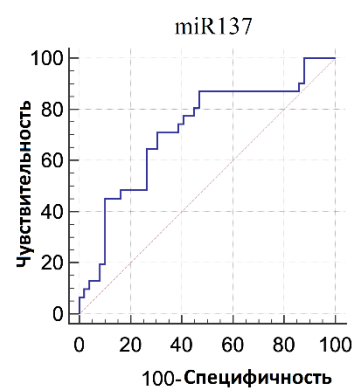
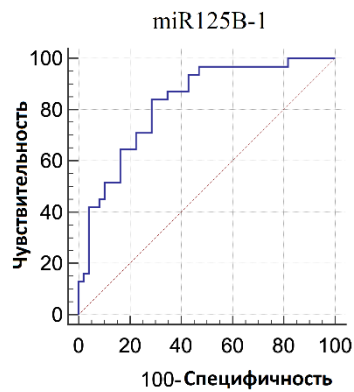
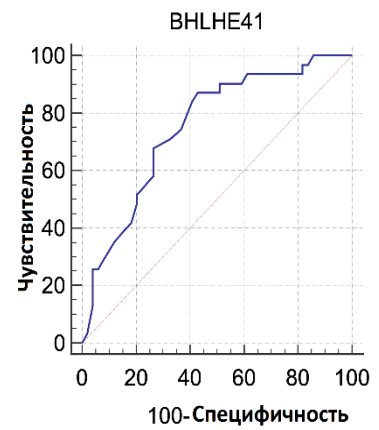
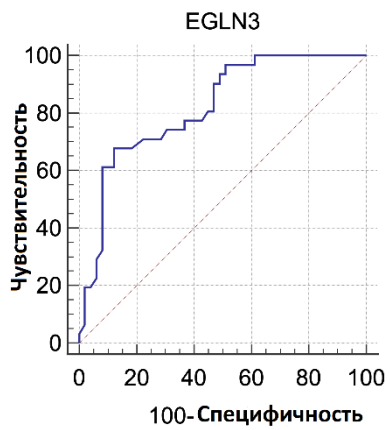
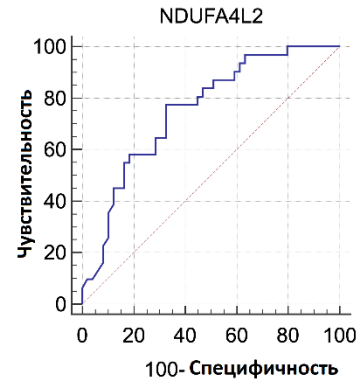
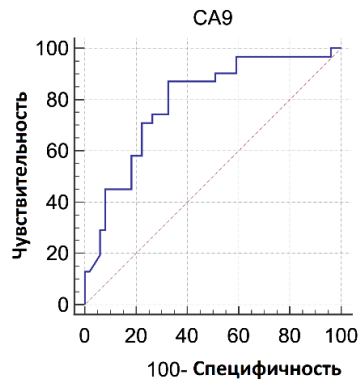
Примечание: уровни значимости (p) представлены с учетом коррекции методом Бенджамини–Хохберга.

Для анализа характеристик связи уровней экспрессии и метилирования генов с метастатическим потенциалом опухоли использовали ROC-анализ (Таблица 4, Рисунок 2).

Таблица 4 - 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-о 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



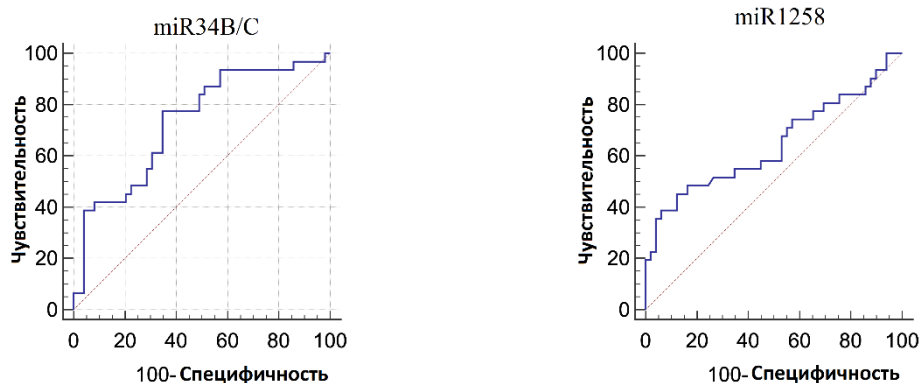


Рисунок 2 - ROC-кривые, полученные при анализе ассоциации уровней экспрессии и метилирования генов с метастазированием скПКР

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 гены *miR125B-1*, *miR137*, *miR375*, *miR193A*, *miR34B/C* (полученные результаты представлены выше в таблицах 2, 3, 4 и на рисунке 2).

Пороговые значения для каждого отдельного гена были определены ROC-анализом. При этом, неблагоприятным прогнозом для развития метастазов является снижение уровня экспрессии ниже порогового значения генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* и увеличение уровня метилирования выше порогового значения 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% , как представлено в таблице 4.

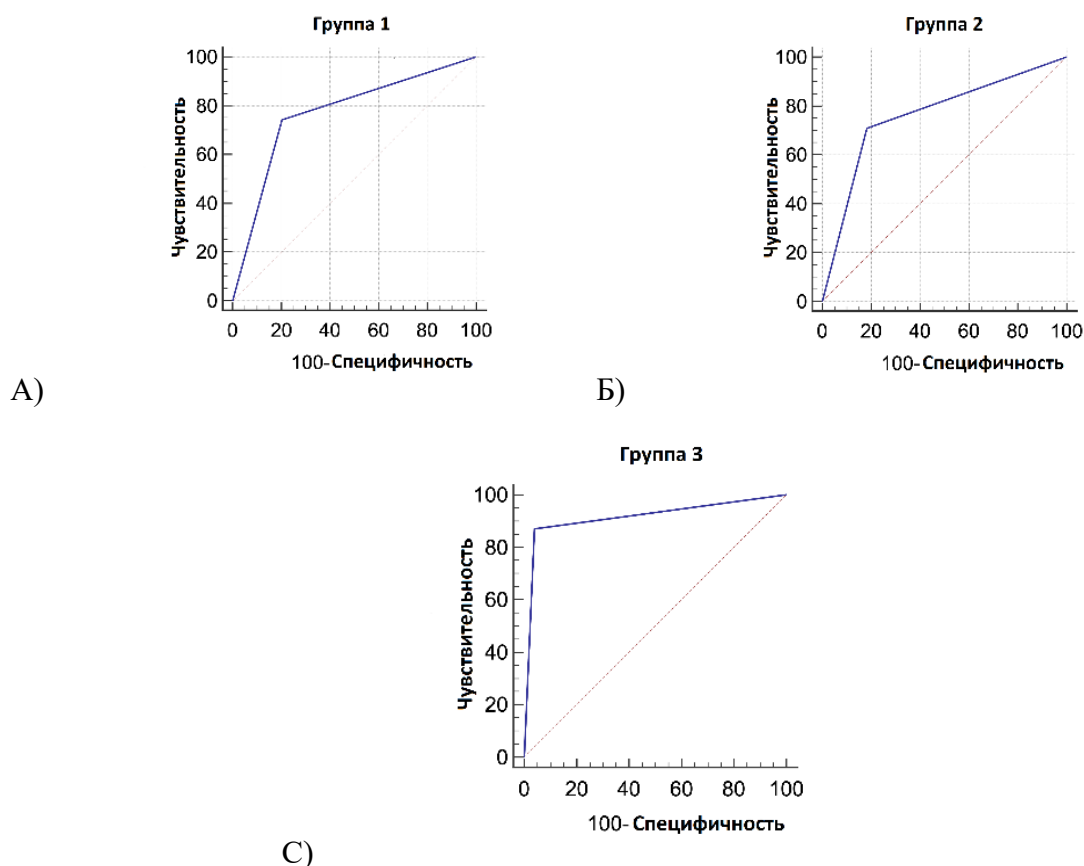
Следовательно, различия значений медиан уровней экспрессии, метод логистической регрессии и ROC-анализ указывают на связь девяти изученных генов с метастазированием скПКР.

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 (Таблица 5, Рисунок 3).

Таблица 5 - Характеристика комбинированных прогностических панелей на основе белок-кодирующих генов и генов микроРНК

Группа генов	Чувствительность/специфичность	Площадь под кривой (AUC)	Достоверность, р (Area=0.5)	Отрицательное предсказательное значение % (95 % CI)	Положительное предсказательное значение % (95 % CI)
<i>CA9</i> <i>NDUFA4L2</i> <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>NDUFA4L2</i> <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 3 - ROC анализ панели маркеров

Одновременный анализ уровня экспрессии белок-кодирующих генов (*CA9, NDUFA4L2, 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.

В таблице 6 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.

Таблица 6 – 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

Продолжение таблицы 6

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

Продолжение таблицы 6

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

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. 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, указанных в таблице 5. 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.

Представленные данные позволяют считать, что разработанная комбинированная панель обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Определенный нами уровень AUC 0,915 (Таблица 5) 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% (Таблица 5).

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.

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 микро-РНК 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.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Идентификация маркеров метастазирования является перспективным направлением в изучении проблемы выбора оптимальной тактики послеоперационного лечения больных скПКР ввиду активного развития современных медицинских технологий и системной терапии. Дальнейшие исследования по теме диссертации имеют перспективы в индивидуализации выбора адъювантного лечения, разработки и усовершенствования методик определения прогноза заболевания и изучения методов профилактики развития метастазов

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Апанович Н. В., Сходство и различие процессов метастазирования и дифференцировки рака почки по экспрессии генов / Н. В. Апанович, **А. В. Матвеев**, П. В. Апанович А. А. Коротаяева, Ф. М. Кипкеева, Т. А. Музаффарова, О. А. Халмурзаев, В. Б. Матвеев, А. В. Карпухин // Онкоурология. — 2021. —Т. 17, № 4. — С.19-25.
2. Apanovich N., Prediction of Distant Metastases in Patients with Kidney Cancer Based on Gene Expression and Methylation Analysis / N. Apanovich, **A. Matveev**, N. Ivanova, A. Burdennyu, P. Apanovich, I. Pronina, E. Filippova, T. Kazubskaya, V. Loginov, E. Braga, A. Alimov. // Diagnostics. – 2023. – №. 13. – P. 2289.