

УДК 616-092

Молекулярно-генетический подход для прогнозирования метастазирования у больных раком почки

Матвеев А.В.¹, Апанович Н.В.², Иванова Н.А.³, Бурдённый А.М.³, Лукина С.С.³, Казубская Т.П.¹,
Брага Э.А.³, Логинов В.И.³, Алимов А.А.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 115478, Москва, Каширское ш., д. 23

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Актуальность. Светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР) – наиболее распространенный и агрессивный среди гистологических типов рака этой локализации. На его долю приходится около 80–90% всех случаев. Заболевание протекает бессимптомно вплоть до тяжёлых стадий и характеризуется высокой частотой летальных исходов, особенно при развитии метастатического процесса. Примерно в 30% случаев при первичной постановке диагноза уже выявляют отдаленные метастазы.

Целью данной работы являлась разработка новых современных методов, позволяющих быстро и надёжно прогнозировать развитие метастазов у больных раком почки для персонализированного лечения.

Методы. На основании клинических и патоморфологических данных были отобраны образцы опухолевой и парной гистологически нормальной ткани почки, и сформирована выборка образцов для проведения расширенного молекулярно-генетического тестирования. 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.

Результаты. По результатам проведенных исследований были выявлены белок-кодирующие гены CA9, NDU4L2, EGLN3 и BHLHE41, снижение экспрессии которых ассоциировано с метастазированием скПКР ($p < 0,05$, ROC-анализ). По результатам анализа метилирования генов, связанных с посттранскрипционной регуляцией экспрессии, были выявлены гены микроРНК, повышение уровня метилирования которых ассоциировано с метастазированием скПКР: MIR125B-1, MIR193A, MIR1258, MIR34B/C ($p < 0,002$, ROC-анализ). На основании полученных данных была сформирована комбинированная панель генов для прогнозирования метастазирования скПКР. В панель вошли гены микроРНК и гены, кодирующие белки.

Заключение. 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 83%.

Ключевые слова: светлоклеточный почечно-клеточный рак; метастазирование; дифференциальная экспрессия генов; метилирование генов.

Для цитирования: Матвеев А.В., Апанович Н.В., Иванова Н.А., Бурдённый А.М., Лукина С.С., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И., Алимов А.А. Молекулярно-генетический подход для прогнозирования метастазирования у больных раком почки. Патогенез. 2023; 21(1): 46-53.

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.46-53

Для корреспонденции: Матвеев Алексей Всеволодович, e-mail: A.matveevnmc@yandex.ru; Апанович Наталья Владимировна, e-mail: apanovichn81@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» и при финансовой поддержке Государственного задания № FGFGU-2022-0007 ФГБНУ «НИИОПП».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина за сбор и клинико-гистологическую характеристику образцов рака почки.

Авторы благодарят доктора биологических наук, профессора Александра Васильевича Карпухина за научное и методическое консультирование при выполнении данного исследования.

Поступила: 17.01.2023

Molecular genetic approach for metastasis prediction in renal cancer patients

Matveev A.V.¹, Apanovich N.V.², Ivanova N.A.³, Burdenny A.M.³, Lukina S.S.³, Kazubskaya T.P.¹, Braga E.A.³, Loginov V.I.³, Alimov A.A.²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation

²Academician N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics,
Moskvorech'ye St. 1, Moscow 115522, Russian Federation

³Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Background. Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common and aggressive of the histological subtypes of kidney cancer. It accounts for about 80 to 90% of all cases. The disease is asymptomatic up to the late stages, and it has a high mortality rate, especially when metastatic processes develop. About 30% of patients have distant metastases by the time the disease is detected.

The aim of this study was to develop a new, modern method for predicting the risk of metastases in patients with kidney cancer so as to optimize subsequent, personalized treatment.

Methods. Based on clinical and pathomorphological data, paired samples of tumor and normal tissue were selected for advanced molecular genetic study. RNA and DNA were isolated by standard methods. Gene expression was analyzed using TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA). The degree of gene methylation was assessed using bisulfite conversion of DNA and quantitative methylation-specific real-time PCR (MS-PCR). Statistical analysis was performed with Statistica 10.0 software.

Results. Decreased expression of the protein-coding genes CA9, NDU4L2, EGLN3, and BHLHE41 was associated with the development of metastases during the first-year follow-up ($p < 0.05$, ROC analysis). In addition, increased methylation levels of MIR125B-1, MIR193A, MIR1258, MIR34B/C genes were associated with metastasis ($p < 0.002$, ROC-analysis). Based on these findings, a new panel of genes was created for predicting the risk of metastases in patients with kidney cancer.

Conclusion. A newly proposed gene panel allows identification with high sensitivity and specificity patients whose tumor has metastatic potential. With a negative test, there is an 83% chance that there are no metastases.

Key words: clear cell renal cell carcinoma; metastasis; differential gene expression; gene methylation.

For citation: Matveev A.V., Apanovich N.B., Ivanova N.A., Bourdenny A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I., Alimov A.A. [Molecular genetic approach for metastasis prediction in renal cancer patients]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2023; 21(1): 46-53. (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2023.01.46-53

For correspondence: Matveev Alexey Vsevolodovich, e-mail: A.matveevnmic@yandex.ru; Apanovich Natalia Vladimirovna, e-mail: apanovichn81@mail.ru

Funding. The research was a State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre for Medical Genetics

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors are grateful to the staff of the Blokhin National Medical Research Center of Oncology for the collection and clinical and histological characterization of kidney cancer specimens.

The authors thank Professor Alexander Vasilievich Karpukhin for scientific and methodological advice in performing this study.

Received: 17.01.2023

Введение

Согласно данным официальной статистики, в РФ средний возраст больных с впервые в жизни установленным диагнозом рак почки у мужчин составляет 61,2 года; у женщин – 64,5 года [1]. Летальность в период первого года наблюдения – около 20% [2]. В 70–90% случаев выявляемые опухоли являются почечно-клеточными карциномами, среди которых 70% относятся к светлоклеточному почечно-клеточному раку (скПКР). Примерно у 30% больных с локализованной формой болезни в течение наблюдения развиваются отдалённые метастазы. При этом 5-летняя выживаемость больных скПКР с метастазами составляет 12% [3].

На молекулярном уровне для скПКР характерна дисрегуляция экспрессии генов, регулирующих клеточный метаболизм для преодоления эффекта гипоксии, что ведет к росту опухоли, активации ангиогенеза и метастазированию [4]. В 90% случаев эффект псевдогипоксии обусловлен инактивирующими мутациями в гене VHL, что приводит к накоплению в клетке транс-

крипционного фактора HIF-2 α и активированию фактора транскрипции HIF-1 α , что в итоге кардинально меняет профиль экспрессии генов в клетке [5]. Анализ особенностей изменения уровней экспрессии генов с целью последующего использования этих сведений для прогнозирования течения болезни и развития персонализированного подхода к лечению является важным направлением исследований в современной молекулярной онкоурологии. В частности, сравнительно недавно была проведена оценка прогностической значимости уровней экспрессии генов, ассоциированных с эпителиально-мезенхимальным переходом клеток опухоли. Обнаружено, что высокая экспрессия генов *VIM*, *TWIST1* в сочетании с низким уровнем экспрессии *CDH1* являются маркерами плохого прогноза [6]. Важное место в этой области занимают исследования посттранскрипционной регуляции экспрессии генов на уровне микроРНК (миРНК). В частности, недавно для оценки вероятности прогрессирования рака почки было предложено анализировать уровни экспрессии девяти миРНК, что позволяет комплексно оценить не толь-

ко перспективы прогрессирования заболевания, но особенности иммунного окружения опухоли [7].

Ещё одним направлением исследований является анализ паттернов метилирования генов, вовлечённых в процесс канцерогенеза. Особое внимание уделяется гиперметилированию, инактивирующему гены супрессорных миРНК, что выявлено в различных типах рака, включая скПКР, и может использоваться в качестве биомаркёров для прогнозирования метастазирования [8, 9].

Отличительной особенностью предлагаемого нами подхода для прогнозирования метастазирования у больных раком почки является сочетание в одном исследовании анализа экспрессии белок кодирующих генов, с одной стороны, и оценки уровня метилирования микроРНК – с другой. При проведении пробного тестирования разработанная панель генов обеспечила прогнозирование развития метастазов при раке почки с чувствительностью 81% и специфичностью 93%.

Материалы и методы исследования

Образцы опухолей светлоклеточного почечно-клеточного рака и нормальной ткани того же органа, полученные во время хирургических операций, собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» имени Н.Н. Блохина; исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, одобрена этическим комитетом института и выполнялась по международным правилам работы с биоматериалом людей.

После забора ткань сразу замораживалась и хранилась при температуре -70°C . Всего был исследован 31 парный образец ткани от пациентов с скПКР. В выборку были включены 16 пациентов с метастатическим и 15 с неметастатическим скПКР. Критерием включения в выборку являлось заключение гистологического исследования рака почки (табл. 1).

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции. Для выделения РНК использовали набор miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Выделение производили согласно инструкции к набору. Этапы выделения РНК включают лизирование ткани, фенольную экстракцию, доочистку на колонке. Дополнительную очистку РНК проводили с помощью набора RNA Clean-Up and Concentration Kit (NORGEN). 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 набор 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*, *NDUF4L2*, *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 нор-

Таблица 1

Характеристика выборки больных

№	Без метастазов			С метастазами			
	Пол пациента	Возраст пациента	Стадия TNM	№	Пол пациента	Возраст пациента	Стадия TNM
1	М	46	T1aNxM0	16	Ж	67	T3cN1M1
2	М	68	T3bN0M0	17	М	57	T1bNxM1
3	Ж	76	T1N0M0	18	М	51	T2NxM1
4	М	65	T3aN0M0	19	М	47	T3bN1M1
5	Ж	66	T3cN0M0	20	М	58	T3bN1M1
6	Ж	72	T3cN0M0	21	М	45	T3aN1M1
7	М	62	T3aN0M0	22	М	47	T3aN1M1
8	Ж	62	T2aN0M0	23	Ж	62	T3bN0M1
9	Ж	73	T1aN0M0	24	М	43	T3aN0M1
10	М	68	T3aN0M0	25	М	58	T3cN0M1
11	Ж	65	T3aN0M0	26	М	59	T3aN1M1
12	Ж	48	T1aN0M0	27	Ж	43	T3bN0M1
13	М	51	T2N0M0	28	Ж	65	T3aN2M1
14	М	50	T3aN0M0	29	М	54	T3aN0M1
15	М	62	T2aN1M0	30	Ж	63	T3bN0M1
				31	Ж	73	T3cNxM1

мальной ткани той же почки проводили с использованием программного обеспечения QuantStudio™ Design & Analysis Software методом $\Delta\Delta Ct$ (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 [10]. 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 *ACTB* с использованием олигонуклеотидов специфичных к неконвертированной матрице. В качестве контролей для неметилованных 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 [11]. Пороговый уровень = $N(\text{mean}) + 2SD$, где SD – стандартное отклонение, $N(\text{mean})$ – средний уровень метилирования в норме (доноры).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. При сравнении частотных показателей использовали точный критерий Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для поиска корреляции с метастазированием использовали тест Манна-Уитни (*U*-test). Оптимальные системы маркеров выбирали по результатам ROC-анализа, проведенного с помощью ресурса MedCalc https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. Наборы маркеров оценивали по величинам чувствительности, специфичности и по площади под кривой (AUC, area under curve) на ROC-кривых.

Результаты исследования

В 31 парном образце ткани от пациентов с метастатическим и неметастатическим скПКР были определены уровни экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*. Результаты исследования показали, что значимое снижение уровня экспрессии этих генов связано с метастазированием (табл. 2). Эти данные дополняют результаты предыдущих исследований анализа профиля экспрессии генов рака почки [12]. Далее была отобрана группа генов микроРНК (*MIR1258*, *MIR34B/C*, *MIR107*, *MIR132*, *MIR125B-1*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR193A*, *MIR203A*) для анализа связи с метастазированием светлоклеточного рака почки. В основу формирования группы вошли ранее опубликованные данные [10]. Значимые различия уровней экспрессии и метилирования представлены в табл. 2.

Согласно полученным результатам, была определена панель маркеров. Для анализа прогноза метастатического потенциала использовали ROC-анализ (табл. 3).

В результате проведенного анализа определили, что наибольшую значимость для составления панели маркеров метастазирования играют гены *CA9*, *NDUFA4L2*, а среди генов микроРНК метастатическим потенциалом обладают *MIR193A*, *MIR1258*, *MIR34B/C* (табл. 2, 3). При этом, можно предположить, что неблагоприятным прогнозом для развития метастазов является снижение уровня экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, и увеличение уровня метилирования генов, кодирующих микроРНК *MIR193A*, *MIR1258*, *MIR34B/C*. Для этих генов показатели чувствительности находятся в диапазоне 75% – 93%, а специфичности – в диапазоне 73% – 93% (табл. 3).

С целью оценки практической значимости полученных данных была составлена комбинированная система маркеров и проведена оценка их прогностической значимости для возможности последующего использования при молекулярно-генетическом тестировании образцов ткани светлоклеточного рака почки (табл. 4). Результаты ROC анализа определили, что для предсказания возникновения метастазов у больного скПКР, необходимо выявление изменений (повышения метилирования генов микроРНК или снижения экспрессии белок кодирующих генов) минимум пяти маркеров из восьми.

Таблица 2.

Значения медиан уровней экспрессии и метилирования генов в группах опухолей скПКР

Ген	Ме, уровни экспрессии			Ме, уровни метилирования			
	в группе без метастазов	в группе с метастазами	<i>p</i> (<i>U</i> -test)	Ген	в группе без метастазов	в группе с метастазами	<i>p</i> (<i>U</i> -test)
<i>CA9</i>	163,20	8,55	0,002	<i>MIR125B-1</i>	26,02	72,66	0,001
<i>NDUFA4L2</i>	41,10	10,00	0,007	<i>MIR193A</i>	22,74	72,04	0,007
<i>EGLN3</i>	15,30	2,25	0,020	<i>MIR1258</i>	0,96	5,87	0,009
<i>BHLHE41</i>	3,90	2,00	0,046	<i>MIR34B/C</i>	28,84	68,58	0,008

Представленные данные позволяют считать, что разработанная комбинированная панель обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Определенный нами уровень AUC 0,873 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 83%.

На рис. 1 представлен графический результат ROC анализа.

Обсуждение

Определение значимых маркеров метастазирования при светлоклеточном раке почки является приоритетным направлением исследования, поскольку в настоящее время подтвержденных маркеров не существует. Все исследования по данной проблеме носят поисковый

характер и представляют отдельные результаты, которые пока не объединены в систему. Полученные нами результаты могут помочь дополнить факты о связи используемых в работе маркеров с патогенезом скПКР.

В результате проведенного нами исследования определен набор генов для прогноза развития метастазов скПКР. В основе оценки возможности развития метастазов лежит изменение уровня экспрессии мРНК генов *CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* и/или метилирования генов миРНК *MIR125B-1*, *MIR193A*, *MIR1258*, *MIR34B/C* в опухоли.

Известно, что инициация и прогрессия рака почки связана с нерегулируемой транслокацией фактора HIF-1 α в ядро, где он димеризуется с конститутивно экспрессируемым фактором HIF1b, образуя комплекс, активирующий гены в ответ на гипоксию. Активация экспрессии генов *CA9*, *NDUF4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41* отобранных в работу, осуществляется по этому механизму. Однако, в ходе роста опухоли, уровень их экспрессии меняется. Так, снижение экспрессии гена *CA9* у пациентов с пло-

Таблица 3

Параметры ассоциации уровней экспрессии и метилирования генов с метастазированием скПКР

Гены	Площадь под ROC кривой (AUC)	95% доверительный интервал	Пороговое значение	Уровень значимости (площадь=0.5)	Чувствительность	Специфичность
CA9	0,888	0,722 – 0,972	$\leq 33,1$ *	<0,001	81,25	93,33
NDUFA4L2	0,785	0,602 – 0,912	$\leq 18,5$ *	<0,001	75,00	73,33
EGLN3	0,754	0,567 – 0,890	$\leq 3,1$ *	0,007	62,5	93,33
BHLHE41	0,696	0,505 – 0,847	$\leq 2,2$ *	0,048	62,50	86,67
MIR125B-1	0,858	0,686 – 0,957	$> 31,39$ **	<0,001	93,75	66,67
MIR193A	0,788	0,604 – 0,913	$> 39,13$ **	0,001	87,60	87,50
MIR1258	0,779	0,595 – 0,907	$> 1,51$ **	0,002	75,00	86,67
MIR34B/C	0,783	0,599 – 0,910	$> 49,98$ **	<0,001	75,00	73,33

Примечание: * – уровень экспрессии; ** – уровень метилирования.

Таблица 4

Характеристика комбинированной прогностической панели на основе белок кодирующих генов и генов миРНК

Группа генов	Чувствительность/ Специфичность	AUC	P	Вероятность, что метастазы отсутствуют при отрицательном тесте/95% ДИ
<i>CA9</i> <i>NDUFA4L2</i> <i>EGLN3</i> <i>BHLHE41</i> <i>MIR125B-1</i> <i>MIR193A</i> <i>MIR1258</i> <i>MIR34B/C</i>	81,25/93,33	0,873	$<0,0001$	83,33 (64,32 – 93,27)

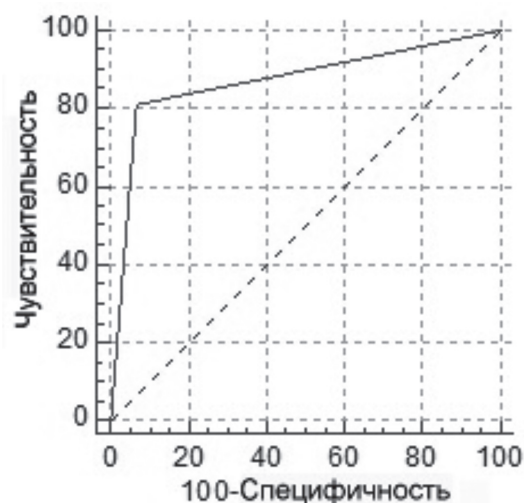


Рис. 1. ROC анализ панели маркеров *CA9*, *NDUFA4L2*, *EGLN3*, *BHLHE41*, *MIR125B-1*, *MIR193A*, *MIR1258*, *MIR34B/C*.

хим прогнозом ряд исследователей связывают с активацией путей АКТ и mTOR, что делает дальнейший рост опухоли менее зависимым от гипоксии и переводит его на альтернативный путь [13]. 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 опухоли [14]. Пониженный уровень экспрессии гена *EGLN3* ведет к нарушению гидроксиглирования внеклеточной сигнал-регулируемой киназы 3 (Erk3) — одного из ключевых игроков, регулирующих прогрессию опухоли [15]. Значение повышенной экспрессии гена *BHLHE41* для прогрессирования заболевания в настоящее время недостаточно понятно, однако показано, что подавление его экспрессии в условиях *in vitro* ведет к ингибированию пролиферации [16]. Таким образом, с теоретической точки зрения, выявление пониженной экспрессии перечисленных генов позволяет судить о степени активации молекулярных механизмов опухолевой прогрессии в клетке.

В нашем исследовании мы определили 4 гена мРНК (*MIR125B-1*, *MIR193A*, *MIR1258*, *MIR34B/C*) как связанные с метастазированием. Известно, что увеличение уровня метилирования этих генов мРНК способствует активации экспрессии мРНК генов, являющихся для них мишенями. В частности, метилирование гена *MIR34B/C* усиливает экспрессию генов, вовлеченных в р53 опосредованную сигнальную сеть, что способствует активации клеточной пролиферации [17]. Метилирование гена *MIR1258* влияет на количество мРНК копий лиганда программируемой клеточной смерти PD-L1 (programmed cell death ligand-1), что способствует увеличению количества белкового продукта на внешней мембране клетки и ускользанию её от иммунного надзора [18]. В крупном международном исследовании, в котором изучали связь между повышенным уровнем экспрессии miR-125a-3p и ангиогенезом скПКР, обнаружили взаимодействие данной мРНК с геном PinX1. Исследователи установили, что подавление ангиогенеза опухоли связано с увеличенным уровнем экспрессии miR-125a-3p через тройное взаимодействие PinX1- miR-125a-3p- VEGF [19]. Показана прямая корреляция снижения уровня экспрессии с увеличением уровня метилирования гена *MIR125B-1* [20]. Показано, что продукт гена *MIR193A* — 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 раковых заболеваний человека [21]. Таким образом, оценка уровня метилирования перечисленных генов мРНК также позволяет судить о степени активации молекулярных механизмов опухолевой прогрессии в клетке.

Отличительной особенностью предлагаемого нами подхода для прогнозирования метастазирования у больных раком почки является сочетание в одном исследова-

нии анализа экспрессии и метилирования двух разных групп генов, кодирующих белок и мРНК. 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, что способствует повышению прогностической точности при тестировании.

Заключение

Предложенная панель генов с высокой вероятностью позволяет предсказать развитие метастазов на основе анализа уровня экспрессии генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE41*, *EGLN3* и метилирования генов мРНК *MIR125B-1*, *MIR193A*, *MIR1258*, *MIR34B/C*. Дальнейшее использование разработанной панели для характеристики клинических образцов позволит уточнить область ее применения в рамках концепции оказания персонализированной медицинской помощи.

Список литературы

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность)*. МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
2. Мерабишвили В.М., Полторацкий А.Н., Носов А.К., Артемьева А.С., Мерабишвили Э.Н. Состояние онкологической помощи в России. Рак почки (заболеваемость, смертность, достоверность учета, одногодичная и погодичная летальность, гистологическая структура). Часть 1. *Онкоурология*. 2021; 17(2): 182–194. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-2-182-194
3. Makino T., Kadomoto S., Izumi K., Mizokami A. Epidemiology and Prevention of Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(16): 4059. DOI: 10.3390/cancers14164059
4. Zhang Z., Li Q., Wang F., Ma B., Meng Y., Zhang Q. Identifying Hypoxia Characteristics to Stratify Prognosis and Assess the Tumor Immune Microenvironment in Renal Cell Carcinoma. *Front Genet*. 2021; 14(12): 606816. DOI: 10.3389/fgene.2021.606816
5. Linehan W.M., Ricketts C.J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nat. Rev. Urol*. 2019; 16: 539–552. DOI: 10.1038/s41585-019-0211-5
6. Xu H., Xu W.H., Ren F., Wang J., Wang H.K., Cao D.L., Shi G.H., Qu Y.Y., Zhang H.L., Ye D.W. Prognostic value of epithelial-mesenchymal transition markers in clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(1): 866–883. DOI: 10.18632/aging.102660
7. Xu C., Zeng H., Fan J., Huang W., Yu X., Li S., Wang F., Long X. A novel nine-microRNA-based model to improve prognosis prediction of renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2022; 22(1): 264. DOI: 10.1186/s12885-022-09322-9
8. Patil N., Abba M.L., Zhou C., Chang S., Gaiser T., Leupold J.H., Allgayer H. Changes in Methylation across Structural and MicroRNA Genes Relevant for Progression and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancers*. 2021; 13: 5951. DOI: 10.3390/cancers13235951
9. Логинов В.И., Береснева Е.В., Казубская Т.П., Брага Э.А., Карпучин А.В. Метилирование 10 генов микроРНК при светлоклеточном раке почки и их диагностическое значение. *Онкоурология*. 2017; 3(13): 27–33. DOI:org/10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33
10. Логинов В.И., Бурдённий А.М., Филиппова Е.А., Пронина И.В., Лукина С.С., Казубская Т.П., Карпучин А.В., Ходырев Д.С., Брага Э.А. Аберрантное метилирование 21 гена микрорнк при раке молочной железы: наборы генов, связанных с показателями прогрессии, и система маркеров для прогноза лимфогенного метастазирования. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 172(7): 81–86. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-7-81-86

11. Lehmann U., Berg-Ribbe I., Wingen L.U., Brakensiek K., Becker T., Klempnauer J., Schlegelberger B., Kreipe H., Flemming P. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(10): 3654–3660. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2462
12. Apanovich N., Peters M., Apanovich P., Mansorunov D., Markova A., Matveev V., Karpukhin A. The Genes-Candidates for Prognostic Markers of Metastasis by Expression Level in Clear Cell Renal Cell Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(1): 30. DOI: 10.3390/diagnostics10010030
13. Courcier J., de la Taille A., Nourieh M., Leguerner I., Lassau N., Ingels A. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma, Implications for Disease Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7146. DOI: 10.3390/ijms21197146
14. Brown J.A., Bourke E., Eriksson L.A., Kerin M.J. Targeting cancer using KAT inhibitors to mimic lethal knockouts. *Biochem. Soc. Trans.* 2016; 44: 979–986. DOI: 10.1042/BST20160081
15. Tamukong P.K., Kuhlmann P., You S., Su S., Wang Y., Yoon S., Gong J., Figlin R.A., Janes J.L., Freedland S.J., Halabi S., Small E.J., Rini B.I., Kim H.L. Hypoxia-inducible factor pathway genes predict survival in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* 2022; 40(11): 495.e1–495.e10. DOI: 10.1016/j.urolonc.2022.07.010
16. Shen Z., Zhu L., Zhang C., Cui X., Lu J. Overexpression of BHLHE41, correlated with DNA hypomethylation in 3'UTR region, promotes the growth of human clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2019; 41(4): 2137–2147. DOI: 10.3892/or.2019.7004
17. Kaller M., Hüntten S., Siemens H., Hermeking H. Analysis of the p53/microRNA Network in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2022; 1385: 187–228. DOI: 10.1007/978-3-031-08356-3_7
18. Wang L.Q., Kumar S., Calin G.A., Li Z., Chim C.S. Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PDL1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification. *Br. J. Haematol.* 2020; 190(2): 249–261. DOI: 10.1111/bjh.16517
19. Hou P, Li H, Yong H, Chen F, Chu S, Zheng J, Bai J. PinX1 represses renal cancer angiogenesis via the mir-125a-3p/VEGF signaling pathway. *Angiogenesis.* 2019; 22(4): 507–519. DOI: 10.1007/s10456-019-09675-z
20. Chen H, Xu Z. Hypermethylation-Associated Silencing of miR-125a and miR-125b: A Potential Marker in Colorectal Cancer. *Dis. Markers.* 2015; 2015: 345080. DOI: 10.1155/2015/345080
21. Ngu S.F., Chan K.K., Yang H., Ngan H.Y., Chan D.W. Methylation-associated silencing of miR-193a-3p promotes ovarian cancer aggressiveness by targeting GRB7 and MAPK/ERK pathways. *Theranostics.* 2018; 8(2): 423–436. DOI: 10.7150/thno.22377
6. Xu H., Xu W.H., Ren F., Wang J., Wang H.K., Cao D.L., Shi G.H., Qu Y.Y., Zhang H.L., Ye D.W. Prognostic value of epithelial-mesenchymal transition markers in clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(1): 866–883. DOI: 10.18632/aging.102660
7. Xu C., Zeng H., Fan J., Huang W., Yu X., Li S., Wang F., Long X. A novel nine-microRNA-based model to improve prognosis prediction of renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2022; 22(1): 264. DOI: 10.1186/s12885-022-09322-9
8. Patil N., Abba M.L., Zhou C., Chang S., Gaiser T., Leupold J.H. Allgayer H. Changes in Methylation across Structural and MicroRNA Genes Relevant for Progression and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancers.* 2021; 13: 5951. DOI: 10.3390/cancers13235951
9. Loginov V.I., Beresneva E.V., Kazubskaya T.R. Braga E.A., Karpukhin A.V. [Methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their diagnostic value]. *Onkourologiya [Cancer Urology]*. 2017;13(3): 27-33. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33
10. Loginov V.I., Burdenny A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Karpukhin A.V., Khodyrev D.S., Braga E.A. [Aberrant methylation of 21 microrna genes in breast cancer: sets of genes associated with progression marks and a system of markers for predicting metastasis]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2021; 172(7): 81–86. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-7-81-86 (in Russian)
11. Lehmann U., Berg-Ribbe I., Wingen L.U., Brakensiek K., Becker T., Klempnauer J., Schlegelberger B., Kreipe H., Flemming P. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(10): 3654–3660. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2462
12. Apanovich N., Peters M., Apanovich P., Mansorunov D., Markova A., Matveev V., Karpukhin A. The Genes-Candidates for Prognostic Markers of Metastasis by Expression Level in Clear Cell Renal Cell Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(1): 30. DOI: 10.3390/diagnostics10010030
13. Courcier J., de la Taille A., Nourieh M., Leguerner I., Lassau N., Ingels A. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma, Implications for Disease Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7146. DOI: 10.3390/ijms21197146
14. Brown J.A., Bourke E., Eriksson L.A., Kerin M.J. Targeting cancer using KAT inhibitors to mimic lethal knockouts. *Biochem. Soc. Trans.* 2016; 44: 979–986. DOI: 10.1042/BST20160081
15. Tamukong P.K., Kuhlmann P., You S., Su S., Wang Y., Yoon S., Gong J., Figlin R.A., Janes J.L., Freedland S.J., Halabi S., Small E.J., Rini B.I., Kim H.L. Hypoxia-inducible factor pathway genes predict survival in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* 2022; 40(11): 495.e1–495.e10. DOI: 10.1016/j.urolonc.2022.07.010
16. Shen Z., Zhu L., Zhang C., Cui X., Lu J. Overexpression of BHLHE41, correlated with DNA hypomethylation in 3'UTR region, promotes the growth of human clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2019; 41(4): 2137–2147. DOI: 10.3892/or.2019.7004
17. Kaller M., Hüntten S., Siemens H., Hermeking H. Analysis of the p53/microRNA Network in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2022; 1385: 187–228. DOI: 10.1007/978-3-031-08356-3_7
18. Wang L.Q., Kumar S., Calin G.A., Li Z., Chim C.S. Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PDL1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification. *Br. J. Haematol.* 2020; 190(2): 249–261. DOI: 10.1111/bjh.16517
19. Hou P, Li H, Yong H, Chen F, Chu S, Zheng J, Bai J. PinX1 represses renal cancer angiogenesis via the mir-125a-3p/VEGF signaling pathway. *Angiogenesis.* 2019; 22(4): 507–519. DOI: 10.1007/s10456-019-09675-z
20. Chen H, Xu Z. Hypermethylation-Associated Silencing of miR-125a and miR-125b: A Potential Marker in Colorectal Cancer. *Dis. Markers.* 2015; 2015: 345080. DOI: 10.1155/2015/345080
21. Ngu S.F., Chan K.K., Yang H., Ngan H.Y., Chan D.W. Methylation-associated silencing of miR-193a-3p promotes ovarian cancer aggressiveness by targeting GRB7 and MAPK/ERK pathways. *Theranostics.* 2018; 8(2): 423–436. DOI: 10.7150/thno.22377

References

1. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. [Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality)]. M.: FSBI Moscow in Russian P.A. Herzen – Branch of the “National Medical Research Center of Radiology”, 2021. 252 p. (in Russian)
2. Merabishvili V.M., Poltorackiy A.N., Nosov A.K., Artem'eva A.S., Merabishvili E.N. [The state of oncology care in Russia. Kidney cancer (morbidity, mortality, index of accuracy, one-year and year-by-year mortality, histological structure). Part 1]. *Onkourologiya [Cancer Urology]*. 2021; 17(2): 182–194. DOI: 10.17650/1726-9776-2021-17-2-182-194 (in Russian)
3. Makino T., Kadomoto S., Izumi K., Mizokami A. Epidemiology and Prevention of Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(16): 4059. DOI: 10.3390/cancers14164059
4. Zhang Z., Li Q., Wang F., Ma B., Meng Y., Zhang Q. Identifying Hypoxia Characteristics to Stratify Prognosis and Assess the Tumor Immune Microenvironment in Renal Cell Carcinoma. *Front Genet.* 2021; 14(12): 606816. DOI: 10.3389/fgene.2021.606816
5. Linehan W.M., Ricketts C.J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. *Nat. Rev. Urol.* 2019; 16: 539–552. DOI: 10.1038/s41585-019-0211-5
6. Xu H., Xu W.H., Ren F., Wang J., Wang H.K., Cao D.L., Shi G.H., Qu Y.Y., Zhang H.L., Ye D.W. Prognostic value of epithelial-mesenchymal transition markers in clear cell renal cell carcinoma. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(1): 866–883. DOI: 10.18632/aging.102660
7. Xu C., Zeng H., Fan J., Huang W., Yu X., Li S., Wang F., Long X. A novel nine-microRNA-based model to improve prognosis prediction of renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2022; 22(1): 264. DOI: 10.1186/s12885-022-09322-9
8. Patil N., Abba M.L., Zhou C., Chang S., Gaiser T., Leupold J.H. Allgayer H. Changes in Methylation across Structural and MicroRNA Genes Relevant for Progression and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancers.* 2021; 13: 5951. DOI: 10.3390/cancers13235951
9. Loginov V.I., Beresneva E.V., Kazubskaya T.R. Braga E.A., Karpukhin A.V. [Methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their diagnostic value]. *Onkourologiya [Cancer Urology]*. 2017;13(3): 27-33. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33
10. Loginov V.I., Burdenny A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Karpukhin A.V., Khodyrev D.S., Braga E.A. [Aberrant methylation of 21 microrna genes in breast cancer: sets of genes associated with progression marks and a system of markers for predicting metastasis]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2021; 172(7): 81–86. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-7-81-86 (in Russian)
11. Lehmann U., Berg-Ribbe I., Wingen L.U., Brakensiek K., Becker T., Klempnauer J., Schlegelberger B., Kreipe H., Flemming P. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(10): 3654–3660. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2462
12. Apanovich N., Peters M., Apanovich P., Mansorunov D., Markova A., Matveev V., Karpukhin A. The Genes-Candidates for Prognostic Markers of Metastasis by Expression Level in Clear Cell Renal Cell Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(1): 30. DOI: 10.3390/diagnostics10010030
13. Courcier J., de la Taille A., Nourieh M., Leguerner I., Lassau N., Ingels A. Carbonic Anhydrase IX in Renal Cell Carcinoma, Implications for Disease Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7146. DOI: 10.3390/ijms21197146
14. Brown J.A., Bourke E., Eriksson L.A., Kerin M.J. Targeting cancer using KAT inhibitors to mimic lethal knockouts. *Biochem. Soc. Trans.* 2016; 44: 979–986. DOI: 10.1042/BST20160081
15. Tamukong P.K., Kuhlmann P., You S., Su S., Wang Y., Yoon S., Gong J., Figlin R.A., Janes J.L., Freedland S.J., Halabi S., Small E.J., Rini B.I., Kim H.L. Hypoxia-inducible factor pathway genes predict survival in metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol.* 2022; 40(11): 495.e1–495.e10. DOI: 10.1016/j.urolonc.2022.07.010
16. Shen Z., Zhu L., Zhang C., Cui X., Lu J. Overexpression of BHLHE41, correlated with DNA hypomethylation in 3'UTR region, promotes the growth of human clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2019; 41(4): 2137–2147. DOI: 10.3892/or.2019.7004
17. Kaller M., Hüntten S., Siemens H., Hermeking H. Analysis of the p53/microRNA Network in Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2022; 1385: 187–228. DOI: 10.1007/978-3-031-08356-3_7
18. Wang L.Q., Kumar S., Calin G.A., Li Z., Chim C.S. Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PDL1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification. *Br. J. Haematol.* 2020; 190(2): 249–261. DOI: 10.1111/bjh.16517
19. Hou P, Li H, Yong H, Chen F, Chu S, Zheng J, Bai J. PinX1 represses renal cancer angiogenesis via the mir-125a-3p/VEGF signaling pathway. *Angiogenesis.* 2019; 22(4): 507–519. DOI: 10.1007/s10456-019-09675-z
20. Chen H, Xu Z. Hypermethylation-Associated Silencing of miR-125a and miR-125b: A Potential Marker in Colorectal Cancer. *Dis. Markers.* 2015; 2015: 345080. DOI: 10.1155/2015/345080
21. Ngu S.F., Chan K.K., Yang H., Ngan H.Y., Chan D.W. Methylation-associated silencing of miR-193a-3p promotes ovarian cancer aggressiveness by targeting GRB7 and MAPK/ERK pathways. *Theranostics.* 2018; 8(2): 423–436. DOI: 10.7150/thno.22377

Сведения об авторах:

Матвеев Алексей Всеволодович — аспирант онкологического отделения хирургических методов лечения №4 (онкоурологии) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Апанович Наталья Владимировна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; <https://orcid.org/0000-0002-9221-115X>

Иванова Наталья Анатольевна — младший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Бурдённый Алексей Михайлович — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Лукина Светлана Сергеевна — научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>

Казубская Татьяна Павловна — доктор медицинских наук, врач-онкогенетик, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>

Брага Элеонора Александровна — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

Логинов Виталий Игоревич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <http://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Алимов Андрей Анатольевич — кандидат биологических наук, PhD, MD, заведующий лабораторией молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»; <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>