УДК 618.11-006.66-036.8-055.2-08:57.052 DOI 10.52313/22278710_2022_4_4

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДТИПЫ СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАЦИЕНТОК

М. Р. Цандекова[1], Н. В. Порханова[2], Д. С. Кутилин[3]

[1] ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Министерства здравоохранения Краснодарского края

[2] ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России

3 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону

Цель исследования. *Изучение показателя копийности генов в тканях больных серозной аденокарциномой яичника и его влияния на выживаемость пациентов.*

Материалы и методы исследования. *В исследование включено 200 женщин с диагнозом серозная аденокарцинома яичника. На первом этапе проводился биоинформационный анализ открытых баз данных. Для идентификации областей генома, размер которых значительно изменялся в ряде образцов опухолей, применяли алгоритмы GISTIC, MutSig и RAE. На втором этапе для высококачественного выделения опухолевых и нормальных клеток использовали подход, основанный на лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом. Определение относительной копийности генов проводили методом Real-Time qPCR.*

Результаты*. С использованием биоинформационных алгоритмов подобрано 34 гена-маркера серозной аденокарциномы (CYP1-A1, -A2, -B1, CYP19A, ESR1/2, GPER, STS, SULT1-A, -E1, BAX, BCL-2, TP-53, MDM2, CASP-9, CASP-3, CASP-7, CASP-8, PRKCI, SOX2, OCT4, PIK3, PTEN, CMYC, SOX18, AKT1, NOTCH1, BRCA1/2, EXO1, SCNN1A, KRAS, EGFR и BRAF). На выборке 200 пациенток обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генов PIK3CA и BCL2 и снижение копийности BAX, CASP3 и CASP8. На основании отличий по уровню копийности генов было выделено два молекулярных подтипа серозной аденокарциномы, соответствующих двум гистологическим подтипам — высокой (MDM2, SOX2, ESR1, CYP1-B1, SULT1-E1, TP-53, BRCA2) и низкой (PIK3CA, PTEN, BCL2, BAX, CASP-3, CASP-8) степени злокачественности. Эти подтипы также обладали молекулярной гетерогенностью, что позволило разделить каждый из них на подгруппы — для серозной аденокарциномы высокой степени злокачественности — три подгруппы, а для серозной аденокарциномы низкой степени злокачественности — четыре подгруппы. На общую выживаемость пациенток влияла копийность четырех генов — SOX2, SULT1E1, BCL2 и PTEN.*

Заключение. *Исследование позволило выделить на молекулярно-генетическом уровне подтипы серозной аденокарциномы яичников низкой и высокой степени злокачественности, а также особенности их клинического течения.*

Ключевые слова: *серозная аденокарцинома яичников, копийность генов, молекулярные подтипы, выживаемость.*

SEROUS OVARIAN ADENOCARCINOMA MOLECULAR SUBTYPES AND PATIENT SURVIVAL

M. R. Tsandekova[1], N. V. Porkhanova[2], D. S. Kutilin[3]

[1] State Budgetary Healthcare Institution "Clinical Oncologic Dispensary № 1" of the Ministry of Healthcare of Krasnodar Krai

[2] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kuban State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

[3] Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov-on-Don

Objective of the research *is to study the gene copy number in the tissues of patients with serous ovarian adenocarcinoma and its effect on patient survival.*

Materials and Methods of the research. *The study comprised 200 women diagnosed with serous ovarian adenocarcinoma. At the first stage, bioinformatic analysis of open databases was carried out. GISTIC, MutSig and RAE algorithms were used to identify genomic regions whose size varied significantly in a number of tumor samples. At stage 2, for high-quality isolation of tumor and normal cells, an approach based on laser microdissection with non-contact capture was used. The determination of the relative gene copy number was carried out using Real-Time qCR method.*

Results. *Using bioinformatic algorithms, 34 genes were selected as markers of serous ovarian adenocarcinoma (CYP1-A1, -A2, -B1, CYP19A, ESR1/2, GPER, STS, SULT1-A, -E1, BAX, BCL-2, TP-53, MDM2, CASP-9, CASP-3, CASP-7, CASP-8, PRKCI, SOX2, OCT4, PIK3, PTEN, CMYC, SOX18, AKT1, NOTCH1, BRCA1/2, EXO1, SCNN1A, KRAS, EGFR and BRAF). A statistically significant (p<0,05) increase in the copy number of PIK3CA and BCL2 genes and a decrease in the copy number of BAX, CASP3 and CASP8 were found in a sample of 200 patients. Based on differences in gene copy number, 2 molecular subtypes of serous ovarian adenocarcinoma, corresponding to 2 histologic subtypes – high (MDM2, SOX2, ESR1, CYP1-B1, SULT1-E1, TP-53, BRCA2) and low (PIK3CA, PTEN, BCL2, BAX, CASP-3, CASP-8) grade of malignancy, were identified. These subtypes possessed also molecular heterogeneity, that made it possible to divide each of them into subgroups — 3 subgroups for high-grade serous adenocarcinoma, and 4 subgroups – for low-grade serous adenocarcinoma. The overall survival of patients was influenced by the copy number of 4 genes – SOX2, SULT1E1, BCL2 and PTEN.*

Conclusion*. The study gave an opportunity to identify subtypes of serous ovarian adenocarcinoma of low and high grade of malignancy at the molecular genetic level, as well as the intricacies of their clinical course.*

Keywords: *serous ovarian adenocarcinoma, gene copy number, molecular subtypes, survival rate*

Введение

В большинстве стран мира последние десятилетия наблюдается рост показателей заболеваемости раком яичника (РЯ) наряду с незначительным снижением смертности [1, 2]. Данные Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC) свидетельствуют о том, что при имеющейся тенденции к 2030 году заболеваемость и смертность в России в абсолютных числах превысит показатель в 13 000 и 8000 случаев соответственно [3]. В настоящее время РЯ занимает третье место в структуре репродуктивных злокачественных опухолей и является пятой по частоте причиной женской смертности от онкологических заболеваний [4; 5].

Наиболее распространенным подтипом рака яичников является серозная аденокарцинома, в современный стандарт лечения которой входит циторедуктивная операция и химиотерапия на основе платины. Позднее выявление и сложности лечения на этом этапе, связанные с повышенной устойчивостью опухолевых клеток к химиотерапии у большинства больных на поздней стадии, обуславливают высокую актуальность проблемы ранней малоинвазивной диагностики рака яичника и подчеркивают острую необходимость скрининга альтернативных подходов к диагностике, молекулярному типированию (классификации) и лечению пациенток с серозной аденокарциномой [6].

В отечественных и международных исследованиях установлено, что серозная аденокарцинома яичников является гетерогенным заболеванием на гистологическом и на молекулярном уровнях [2].

Традиционно считалось, что из хорошо дифференцированной серозной аденокарциномы низкой степени злокачественности возможно формирование более агрессивной формы рака яичников — серозной аденокарциномы высокой степени злокачественности [7]. Достижения в молекулярной и клинико-патологической характеристиках опухолей показали, что серозная аденокарцинома низкой степени злокачественности не является предшественником серозной карциномы высокой степени злокачественности. Это два отдельных заболевания с различными изменениями в геноме и разным прогнозом. Если следовать этой современной парадигме, то серозную аденокарциному низкой степени злокачественности можно классифицировать как опухоль подтипа 1, которая характеризуется более благоприятным клиническим течением и обладает относительно стабильным генетическим профилем. По этой же концепции серозную аденокарциному высокой степени злокачественности, имеющую более агрессивное клиническое течение, следует классифицировать как опухоль подтипа 2. Эта классификационная схема не только способствует более точной характеристике данного заболевания, но также дает представление о механизмах, лежащих в основе развития рака яичников [8].

Молекулярно-генетические исследования выявили особенности генетической нестабильности для различных подтипов серозной аденокарциномы. Были обнаружены мутации в генах *KRAS, CTNNB1*, *CDKN2A*, *PIK3CA, PTEN, TP53, ARID1A, ERBB2, а также* амплификации в этих генах (амплификации —

увеличение копийности гена, вид генетического полиморфизма [9]).

Именно высокий уровень молекулярно-генетической гетерогенности серозной аденокарциномы яичников препятствует ее эффективной характеристике и оптимизации тактики лечения пациенток. И несмотря на то, что достигнуты существенные успехи в понимании некоторых молекулярно-генетических аспектов формирования и функционирования серозных аденокарцином яичников, их клиническое значение еще полностью не определено. Дальнейшие исследования в области молекулярной характеристики различных гистологических подтипов серозной аденокарциномы могут способствовать разработке более полной классификации этих опухолей, а также разработке новых диагностических и прогностических подходов.

Поэтому **целью исследования** стало изучение показателя копийности генов в тканях больных серозной аденокарциномой яичника и его влияния на выживаемость пациенток.

Материалы и методы исследования

В работе проанализированы данные комплексного клинического и молекулярно-генетического обследования 200 больных серозной аденокарциномой яичника. В исследование были включены 200 женщин, у которых диагностировали серозную аденокарциному яичника. Средний возраст пациенток составлял 57,6 ± 9,8 лет. На рисунке 1 представлен упрощенный дизайн исследования. Первым этапом работы явился биоинформационный анализ баз данных, который включал анализ баз TCGA (The Cancer Genome Atlas), DisGeNET и cBioPortal. На втором этапе для высококачественной дифференцировки опухолевых и нормальных клеток яичников использовали подход, основанный на лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом. Определение относительной копийности генетических локусов в нормальных и опухолевых клетках яичников проводили методом Real-Time qPCR.

Биоинформационный анализ данных. Ключевым этапом исследования стал первичный биоинформационный анализ данных, который выполнялся с использованием баз данных TCGA (The Cancer Genome Atlas, https://portal.gdc.cancer.gov/), DisGeNET (https://www.disgenet.org) и cBioPortal.

Для получения данных из Genomic Data Commons Data Portal (https://portal.gdc.cancer.gov/) использовали пакет TCGABiolinks языка R v.4.0.0 в оболочке Rstudio. Для идентификации областей генома, размер которых значительно увеличивался или уменьшался в ряде образцов опухолей, применяли алгоритмы GISTIC версии 2.0.22, MutSig и RAE [10].

Рис. 1. *Дизайн исследования*

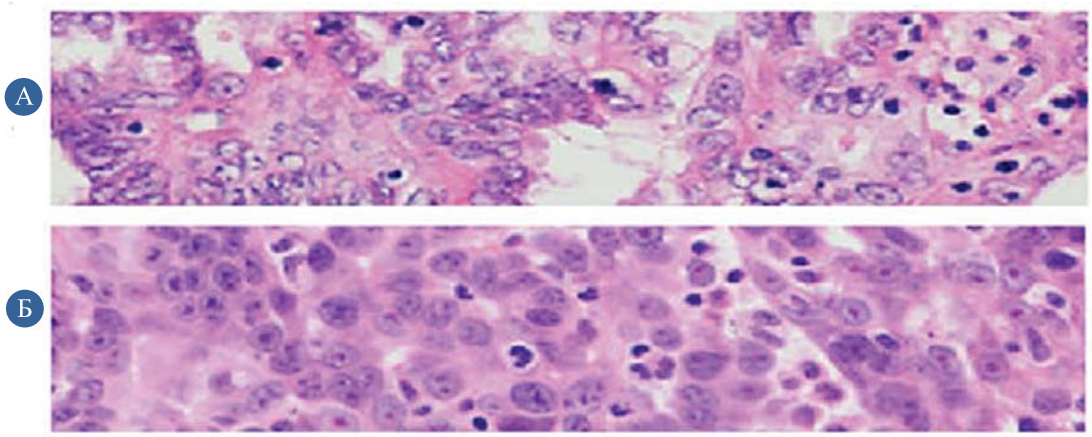


Рис. 2. *Гистологическое исследование (увеличение 200х): А — увеличенный срез серозной аденокарциномы яичников низкой степени злокачественности (однородные ядра, редкие митотические фигуры), Б — увеличенный срез серозной аденокарциномы яичников высокой степени злокачественности (ядерный плеоморфизм, частые митотические фигуры).*

Лазерная микродиссекция с бесконтактным захватом. Материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE-блоков (Formalin-fixed paraffin-embedded) 200 пациенток. Срезы, полученные на микротоме, фиксировались на предметных стеклах с PEN-мембраной (Polyethylene Naphthalate membrane). Выделение и разделение опухолевых и нормальных клеток яичников осуществляли с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия) [11] (рис. 2).

Определение показателя относительной копийности генов в опухолевых и нормальных клетках. Из клеток, извлеченных путем лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом, методом фенол-хлороформной экстракции было выделено 400 образцов ДНК (200 из опухолевых и 200 из нормальных клеток). Полученная ДНК после нормализации использовалась для определения относительной копийности генов методом ПЦР в режиме реального времени (Real-Time qPCR). Для осуществления этого подхода предварительно с использованием базы данных NCBI GenBank были сконструированы последовательности 37 пар синтетических олигонуклеотидов (праймеров), включая пары для референсных локусов (*ACTB, B2M, GAPDH*) (табл. 1).

Список генов, выбранных в ходе биоинформационного анализа, включал 34 локуса, ответственных за регуляцию апоптоза (*BAX, BCL-2, TP-53, MDM2, CASP-9, CASP-3, CASP-7, CASP-8, PRKCI*), пролиферацию (*SOX18, SOX2, OCT4, PIK3, PTEN, AKT1, CMYC*), клеточную дифференциацию (*NOTCH1*), репарацию ДНК (*BRCA1/2* и *EXO1*), поддержание жидкостного гомеостаза клеток (*SCNN1A*), функционирование сигнального пути EGFR (*KRAS, EGFR, BRAF*), рецепцию и метаболизм эстрогенов (*CYP1-A1, -A2, -B1, CYP-19A, ESR1/2, GPER, STS, SULT1-A, -E1*). Количественная ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем EvaGreen®Dye (Biotium, США) проводилась на термоциклере Bio-Rad CFX96.

Амплификация каждого образца осуществлялась в трех технических повторах. При этом усредненные данные по каждому генетическому локусу нормализовались относительно усредненного показателя референсных генов: $\Delta C(t) = C(t)_{(\text{среднее гена мишени})} - C(t)_{(\text{среднее геометрическое 3 референсных генов})}$. Копийность гена (rCN) вычисляли по формуле $rC = E^{-\Delta C(t)}$, где E-эффективность реакции амплификации, рассчитанная по формуле $E = 10^{-1/h}$, где h — коэффициент уравнения $C(t) = h \cdot \log P_0 + b$, полученный путем линейной аппроксимации экспериментальных данных (E = 1,9). Далее вычисляли медиану $rC_{оп}$ для образцов опухолевых клеток и медиану $rCN_{н}$ для образцов нормальных клеток по каждому генетическому локусу и рассчитывали кратность изменения (fold change, FC) копийности генов в опухолевых образцах по отношению

Таблица 1

Список синтетических олигонуклеотидов

№	Наименование гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
1.	*GAPDH*	GCTGAACGGGAAGCTCACC	GCAGGTTTTTCTAGACGGCAT
2.	*ACTB*	CACCCTGAAGTACCCCATTC	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAC
3.	*B2M*	TGAGTGCTGTCTCCATGTTTGT	ATTCTCTGCTCCCCACCTCC
4.	*BAX*	GCCTCCTCTCCTACTTTGGG	AAACACAGTCCAAGGCAGC
5.	*BCL2*	GAGTGGGATGCGGGAGATG	GGTGAAGGGCGTCAGGTG
6.	*SCNN1A*	GTCTTACTTAGCAGGGCGGC	CGAGCTCCTTCTTCCAACCC
7.	*PTEN*	GTCCAGAGCCATTTCCATCCT	TGTCATGTCTGGGAGCCTGT
8.	*TP53*	GGTCGGTGGGTTGGTAGTTT	GTGTGGGATGGGGTGAGATT
9.	*MDM2*	TCTTTGGGACCCATCTACCCT	AGAATGCTTTAGTCCACCTAACCTT
10.	*KRAS*	GGTTGCGCTGACCTAGGAAT	TCCATTTCGGGGCAAACAGT
11.	*EGFR*	CACCGCTTTTGTTCTCGCAA	ATGCCCCAAAGGACCTGATG
12.	*BRAF*	AAATGATTAAGTTGACACAGGAAC	GGTGGATTATGCTCCCCACC
13.	*BRCA1*	GTAGCCCCTTGGTTTCCGTG	CCCTTTCCCGGGACTCTACT
14.	*BRCA2*	TGCATCCCTGTGTAAGTGCAT	ACGTACTGGGTTTTTAGCAAGC
15.	*PRKCI*	TCCCTTGTGTACCAGAACGTC	GCTTGGAAAGTGTGGCCATT
16.	*NOTCH1*	CCTCACTGTTGCCCCACC	CTGGCACACTCGTCTGTGTT
17.	*AKT1*	ATGGACAGGGAGAGCAAACG	TGATGCACCAGCTGACAGG
18.	*EXO1*	GTTACCCGTGTTCTGCGTTG	GAACCCACCCATTAGCCTCC
19.	*SOX18*	AAGCGTCACTGTGGCAAAGA	AGGGCTATTTGGGGAACTGC
20.	*CASP7*	GGGCCCATCAATGACACAGA	GTCTTTTCCGTGCTCCTCCA
21.	*CASP3*	ATGCAGCAAACCTCAGGGAA	TTCACCATGGCTCAGAAGCA
22.	*CASP8*	TCTTTATGATATTGGGGAACAACTG	GTTCTTGCTTCCTTTGCGGA
23.	*CASP9*	CTCCACTTCCCCTGAAGACG	CTGGGTGTGGGCAAACTAGA
24.	*SOX2*	TTTGTCGGAGACGGAGAAGC	CCGGGCAGCGTGTACTTAT
25.	*OCT4*	TTTGTGCCAGGGTTTTTGGG	CTTCACCTTCCCTCCAACCA
26.	*PIK3CA*	GCTTGGGAGGATGCCCAAT	GCTGTGGAAATGCGTCTGGA
27.	*CYP1A1*	CAACTGCTATCTCCTGGAGCC	GCTCCTCTTGGATCTTTCTCTGTA
28.	*CYP1A2*	CTTCGCTACCTGCCTAACCC	GTCCCGGACACTGTTCTTGT
29.	*CYP1B1*	TGCGACTCCAGTTGTGAGAG	GAGTCTCTTGGCGTCGTCAG
30.	*CYP19A*	TTGGTGTGGAGTTTGGCTGT	GCCTGTTGTCCTAACCGAGT
31.	*ESR1*	GGACTGCACTTGCTCCCGT	AGCACAGCCCGAGGTTAGAG
32.	*ESR2*	GGCAAGGCCAAGAGAAGTGG	CTCCAGGAGGGTGAGCACTAT
33.	*GPER*	CTCTTCCCCATCGGCTTTGT	CGGGGATGGTCATCTTCTCGA
34.	*STS*	CCACCCTTTACATCACGGCT	GTGAAGACACTGCCCTCTCC
35.	*SULT1A*	GGACTTCGTGGTTCAGCACAA	CCTCATGAAGGGGGAGATGCT
36.	*SULT1E1*	GAGGAGCTTGTGGACAGGATT	CCTTTCTCATGAAGGGCGACAT
37.	*CMYC*	CACCAGCTGGAGATGGTGAC	AAGCCGCTCCACATACAGCC

к нормальным: $FC = rCN_{опухоль}/rCN_{норма} = E^{-\Delta C(t)опухоль}/E^{-\Delta C(t)норма}$ [12].

Статистическая обработка полученных данных. Статистический и биоинформационный анализ данных выполняли в различных программах и средах программирования, включая Statistica 10.0 (StatSoft, США) и Rstudio (v4.0.1). Для проверки распределения признаков на соответствие закону нормального распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для оценки различий значений количественных показателей применяли *t*-критерий Стьюдента (для нормального распределения) или непараметрический U-критерий Манна-Уитни (для распределения отклоняющегося от нормального). Для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Критерий Краскела-Уоллиса использовали для оценки различий между тремя и более независимыми группами. Метод Каплана-Мейера и лог-ранг тест использовали для оценки продолжительность жизни и времени до прогрессирования. Анализ факторов, влияющих на выживаемость, проводили методом логистической регрессии. Логистический регрессионный анализ осуществляли путем пошагового отбора в модель статистически значимых факторов с заданным порогом значимости. Многофакторный анализ показателей, влияющих на выживаемость, проводили путем регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса.

Кластерный анализ (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) и построение тепловых карт (heat maps) осуществляли с помощью специальных скриптов на языке R. Для разделения генов по функциональным модулям использовали алгоритм FMD (Functional module detection), основанный на методе k-ближайших соседей (k-nearest neighbors algorithm, KNN) и методе определения множества Лувена для кластеризации тесно связанных генетических локусов в отдельные модули, которые подвергаются процедуре функционального обогащения. Результатом выполнения алгоритма является графическое представление сигнальных путей, в которых участвуют гены, по схожести объединенные в кластеры, а также результирующее значение Q. Значение Q каждого члена функционального модуля рассчитывается с использованием одностороннего точного критерия Фишера и поправки Бенджамини-Хохберга для корректировки множественного сравнения. Идентификация общих сигнальных путей исследуемых генов проводилась с помощью алгоритма «сетевой интеграции нескольких ассоциаций», который предсказывает функцию и положение гена в составе сложной сигнальной сети, содержащей множество других генов, а также рассчитывает W-value — особую математическую оценку каждой точки вычисленной сигнальной сети, отражающую силу связи между соседними точками [13].

Результаты исследования

Анализ данных проектов TCGA и cBioPortal. В настоящее время накоплены значительные объемы данных о копийности генов в клетках опухолей, в том числе при серозной аденокарциноме яичников. Чтобы подобрать перечень потенциальных молекулярных маркеров для типирования и диагностики этих опухолей, мы использовали данные проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), которые были извлечены с портала Genomic Data Commons. Портал содержит информацию о мутациях, метилировании ДНК, транскриптоме, экспрессии микро-РНК и копийности генов в образцах тканей (опухоль, здоровая ткань, клетки крови) более чем 14 тысяч больных 38-ю видами онкологических заболеваний, в том числе о 3401 пациентке с диагнозом рак яичников. Для анализа нами были выбраны пациентки с кистозными, муцинозными и серозными опухолями (аденокарциномами) яичников (TCGA-OV, $n = 2541$), но только для 585 пациенток ($n = 585$) были доступны данные по копийности генов в образцах опухоли и прилежащей здоровой ткани.

Результаты анализа копийности генов с помощью алгоритма GISTIC2. GISTIC идентифицирует области генома, размер которых значительно увеличивается или уменьшается в ряде образцов опухолей. Конвейер сначала фильтрует нормальные образцы из сегментированных данных по копийности, проверяя коды TCGA, и затем выполняется GISTIC версии 2.0.22.

В этом анализе было использовано 579 образцов опухолей и было обнаружено 32 значимых результата на уровне фрагментов хромосом, 33 значительных очаговых амплификаций и 40 значительных очаговых делеций.

На рисунке 3 показано геномное положение амплифицированных участков: на оси *X* представлены нормализованные уровни амплификации (вверху) и значимость по Q-value (внизу). Зеленая линия устанавливает границу значимости при значении Q = 0,25.

Наиболее значительные амплификации затрагивали следующие участки хромосом: 8q24.21, 3q26.2, 19q12, 19p13.12, 11q14.1, 1p34.3, 1q21.3, 6p22.3, 7q36.3, 5p15.33, 20q13.33, 1q42.2, Xp11.23, 2q31.2, 12p12.1, 15q26.3, Xq28, 17q25.3, 4p16.3, 10p15.3, 14q11.2, 12p13.33, 8p11.21, 19q13.2, 18q11.2, 10q22.3, 4q13.3, 2p23.2, 20p13, 22q12.2, 12q15, 14q32.33 и 20q11.21.

Аналогично было определено геномное положение участков крупных хромосомных делеций: на оси *X* представлены нормализованные уровни делеций (вверху) и значимость по Q-value (внизу). Зеленая линия устанавливает границу значимости при значении Q = 0,25 (рис. 4).

Наиболее значительные хромосомные делеции наблюдались на участках 19p13.3, 22q13.32, 11p15.5, 6q27, 1p36.11, 13q14.2, 18q23, 5q13.2, 5q12.1, 7p22.2, 4q34.3, 8p23.3,17q11.2, Xp21.1, 8p21.2, 16q23.1, 15q15.1, 3q13.31, 2q22.1, 16p13.3, 3p26.2, 10q23.31, 14q23.3, 19q13.43, 9q34.13, 4q22.1, 2q37.3, 12q23.1, 9p24.3, 19q13.33, 11q25, 12q24.33, 10q25.1, 17p12, 16q22.1, 21q22.3, 10p15.3, 2p25.3, 15q11.2 и 1q41.

Таким образом, в выборке из 579 пациенток было проанализировано изменение копийности 20 795 генов. Из них было выбрано 429 генов, наиболее часто повышающих свою копийность (от 9,2 до 53,9 % рассмотренных случаев), и 429 генов, наиболее часто снижающих свою копийность (от 4,8 до 44,9 % рассмотренных случаев) (табл. 2).

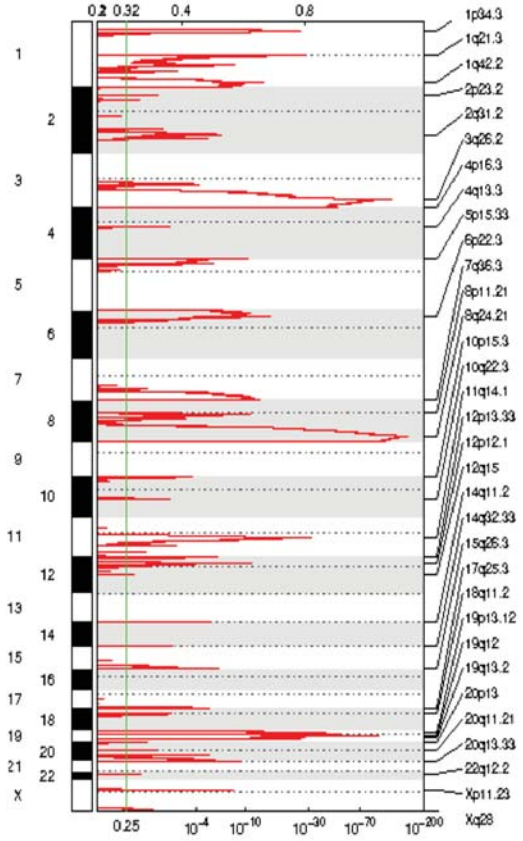


Рис. 3. *Геномное положение амплифицированных областей*

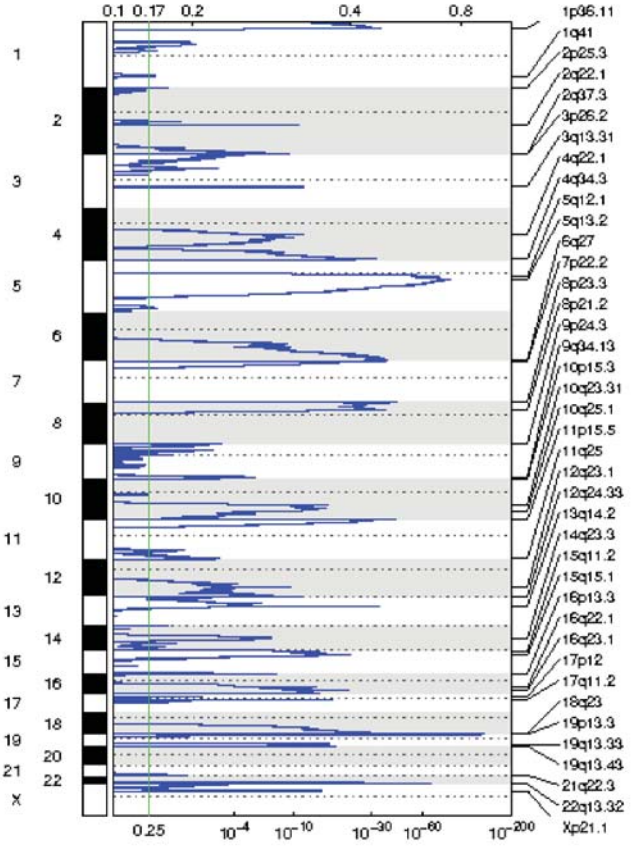


Рис. 4. *Геномные позиции делетированных областей хромосом*

Таблица 2

Топ-100 генов с наибольшей частотой изменения копийности в опухолях яичника

Гены с повышенной копийностью	Частота CNV	Гены с пониженной копийностью	Частота CNV
ADCY8	(53,85 %)	*PTPRS*	(44,96 %)
TG	(52,22 %)	*ENC1*	(37,61 %)
TNIK	(52,14 %)	*MAP1B*	(37,26 %)
DENND3	(50,43 %)	*IQGAP2*	(36,58 %)
FER1L6	(49,74 %)	*MAST4*	(36,07 %)
FAM135B	(48,98 %)	*HSPG2*	(34,64 %)
COL14A1	(48,72 %)	*ECE1*	(34,70 %)
COL22A1	(48,21 %)	*THBS4*	(34,19 %)
PIK3CA	(48,03 %)	*RASGRF2*	(34,02 %)
PARP10	(47,86 %)	*INSR*	(33,68 %)
EIF2B5	(46,93 %)	*UBR4*	(33,62 %)
ZNF7	(46,84 %)	*TCEB3*	(33,50 %)
ECE2	(45,98 %)	*VCAN*	(32,94 %)
MCF2L2	(45,98 %)	*SPEN*	(30,20 %)
ABCF3	(45,81 %)	*ADGRV1*	(30,20 %)
EIF4G1	(45,64 %)	*TIAM2*	(28,72 %)
TRPS1	(42,74 %)	*FBN3*	(28,55 %)
MUC4	(40,68 %)	*VPS13D*	(27,35 %)
CSMD3	(39,42 %)	*PLEKHG1*	(27,35 %)
PKHD1L1	(37,37 %)	*MTHFR*	(27,01 %)
RNF213	(36,69 %)	*ARHGAP35*	(26,84 %)
DNAH17	(35,84 %)	*SYNE1*	(26,45 %)
SETDB1	(33,85 %)	*DCHS1*	(26,15 %)
POGZ	(32,99 %)	*CNGA4*	(25,98 %)
GPR149	(32,65 %)	*SBF2*	(25,81 %)
IGSF10	(32,48 %)	*CSMD1*	(25,26 %)
UBR5	(30,77 %)	*ZNF12*	(24,62 %)
DPP6	(30,60 %)	*SUN1*	(24,44 %)
VPS13B	(30,38 %)	*LRP1B*	(24,23 %)
PTPRN2	(30,43 %)	*ZNF135*	(23,42 %)
TENM4	(30,26 %)	*ZNF551*	(22,70 %)
ITGA10	(30,26 %)	*HIVEP2*	(22,56 %)
PDE4DIP	(30,26 %)	*MUC16*	(22,35 %)
NPR1	(30,09 %)	*ZNF665*	(22,22 %)
MYO7A	(29,91 %)	*ZNF407*	(22,22 %)
UBE3C	(29,91 %)	*MYOM2*	(22,22 %)
CACNA1A	(29,91 %)	*ZNF236*	(22,05 %)
ASH1L	(29,57 %)	*PASK*	(21,71 %)
CNTNAP2	(29,57 %)	*MGA*	(21,67 %)

Продолжение таблицы 2

Гены с повышенной копийностью	Частота CNV	Гены с пониженной копийностью	Частота CNV
GON4L	(29,57 %)	*ZNF471*	(21,20 %)
MACF1	(29,18 %)	*ZNF835*	(21,20 %)
SLC1A6	(29,23 %)	*NLRP2*	(21,20 %)
FLG2	(29,01 %)	*ZNF543*	(21,20 %)
FLG	(28,84 %)	*NLRP13*	(21,20 %)
NUP210L	(28,72 %)	*C10orf12*	(21,20 %)
MYCL	(28,55 %)	*PKD2L1*	(21,20 %)
KMT2C	(28,33 %)	*DNMBP*	(21,20 %)
EPHB6	(28,38 %)	*THBS1*	(21,20 %)
CYP4F2	(28,38 %)	*ZNF317*	(21,03 %)
CPAMD8	(28,21 %)	*COL17A1*	(20,85 %)
HIVEP3	(27,47 %)	*MAPKBP1*	(20,85 %)
ZNF777	(27,35 %)	*POLE*	(20,68 %)
MGAM	(27,18 %)	*C10orf2*	(20,51 %)
HIVEP1	(27,18 %)	*DLC1*	(20,51 %)
LRRK1	(27,01 %)	*COL16A1*	(20,34 %)
SYNM	(26,50 %)	*SORBS1*	(20,17 %)
WNK1	(26,50 %)	*TTBK2*	(20,17 %)
ANKRD27	(26,32 %)	*ADGRB2*	(19,83 %)
DSP	(26,15 %)	*COL6A3*	(19,80 %)
RREB1	(25,98 %)	*RP1L1*	(19,83 %)
IQGAP3	(25,81 %)	*LAMA2*	(19,66 %)
PLXNA4	(25,43 %)	*FAT1*	(19,45 %)
NTRK1	(25,47 %)	*ROS1*	(19,49 %)
CACNA1C	(25,26 %)	*TMEM132D*	(19,15 %)
TEX2	(25,30 %)	*RIMBP2*	(19,15 %)
SHANK2	(25,30 %)	*PLCE1*	(19,15 %)
RYR1	(25,09 %)	*DSEL*	(18,97 %)
RP1	(25,13 %)	*MTUS1*	(18,97 %)
NUP205	(25,13 %)	*ADAM29*	(18,46 %)
SZT2	(24,91 %)	*ATRNL1*	(18,12 %)
RYR2	(24,74 %)	*ITPR1*	(18,12 %)
PTPRF	(24,79 %)	*ALPK2*	(17,95 %)
INSRR	(24,79 %)	*MAP1A*	(17,95 %)
NUMA1	(24,79 %)	*DMD*	(17,75 %)
SUPT5H	(24,62 %)	*LAMA4*	(17,78 %)
CLTCL1	(24,62 %)	*TRPM1*	(17,61 %)
CHD8	(24,62 %)	*DGKD*	(17,26 %)
GRIK3	(24,44 %)	*GIGYF2*	(17,09 %)
PLEKHG2	(24,44 %)	*SETD5*	(16,92 %)

Окончание таблицы 2

Гены с повышенной копийностью	Частота CNV	Гены с пониженной копийностью	Частота CNV
KIF26B	(24,27 %)	*AACS*	(16,58 %)
AHCTF1	(24,10 %)	*DNAH10*	(16,38 %)
JAK3	(24,10 %)	*SPHKAP*	(16,38 %)
TEP1	(24,10 %)	*DCC*	(16,41 %)
LYST	(23,93 %)	*DNAH1*	(16,38 %)
CHD7	(23,72 %)	*ATP2B2*	(16,24 %)
PDE11A	(23,76 %)	*SYNE2*	(16,21 %)
PRRC2A	(22,91 %)	*ABCC8*	(16,24 %)
SMARCA4	(22,91 %)	*NRAP*	(15,90 %)
CTCFL	(22,74 %)	*GRID1*	(15,90 %)
HIST1H2BN	(22,56 %)	*CSMD2*	(15,70 %)
AHNAK2	(22,35 %)	*ZSCAN20*	(15,73 %)
ZFP82	(22,22 %)	*INPP5F*	(15,73 %)
UROD	(22,05 %)	*COL5A3*	(15,56 %)
DDR2	(22,05 %)	*IRS1*	(15,56 %)
ST18	(22,05 %)	*ANKRD11*	(15,38 %)
VWF	(21,84 %)	*ZFYVE26*	(15,38 %)
CPT1A	(21,88 %)	*NAV2*	(15,38 %)
L1CAM	(21,88 %)	*DOCK3*	(15,38 %)
COL4A2	(21,88 %)	*FANCA*	(15,21 %)
PREX2	(21,88 %)	*COL4A4*	(15,21 %)

Из 858 генов, повышающих и понижающих свою копийность в опухолевой ткани яичника, 274 гена являются перекрывающимися. То есть на выборке из 585 пациенток можно выделить 274 гена, копийность которых наиболее часто изменена относительно нормальной ткани, причем одинаково часто наблюдается как увеличение копийности этих генов, так и ее снижение. Поэтому в качестве маркерных генов приемлемо было бы рассмотреть неперекрывающиеся генетические локусы (рис. 5).

Используя данные с cBioPortal for Cancer Genomics, ресурса с открытым исходным кодом для интерактивного исследования многомерных наборов данных по геномике злокачественных опухолей, были выявлены генетические локусы, наиболее часто изменяющие копийность в опухолевой ткани у больных серозной аденокарциномой яичника.

cBioPortal — это инструмент для изучения крупномасштабных наборов геномных данных, полученных от крупных консорциумов, таких как TCGA и TARGET, а также из публикаций отдельных лабораторий. Портал хранит данные о мутациях, количестве копий участков ДНК (содержит как дискретные значения для каждого гена, например, «Deep Deletion» или «Amplification», так и данные log2 или данные о линейном количестве копий генов), данные

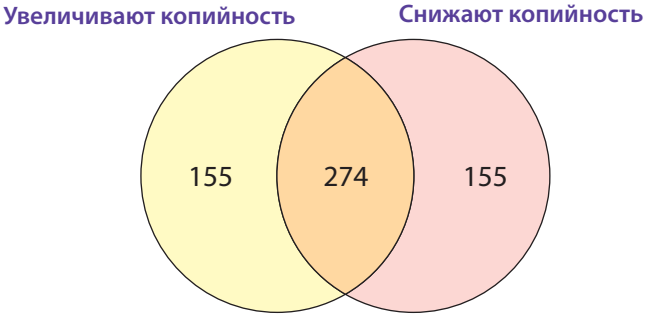


Рис. 5. *Диаграмма Венна, отражающая уникальные и перекрывающиеся гены, которые наиболее часто изменяют свою копийность в опухолях яичника*

экспрессии мРНК и микроРНК, данные об уровне белков (на основе RPPA или масс-спектрометрии), данные о метилировании ДНК и обезличенные клинические данные пациентов.

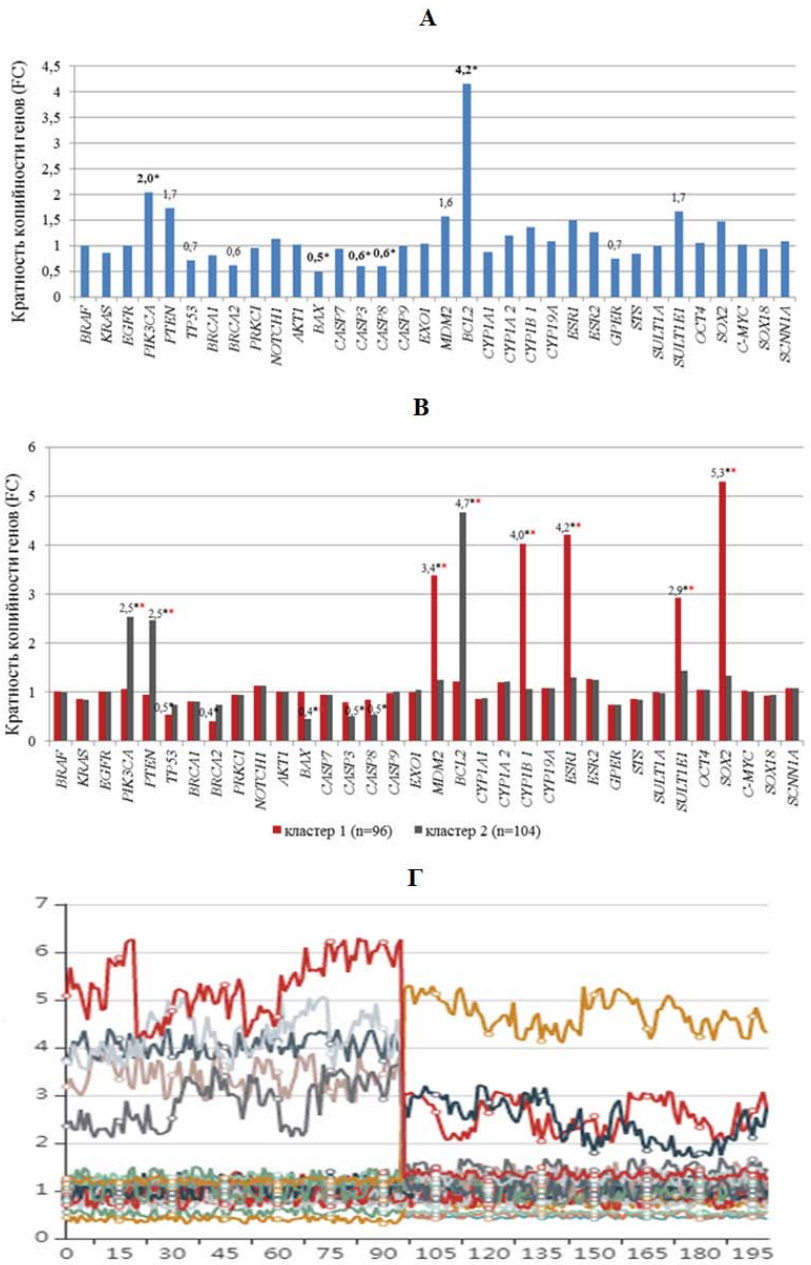
Для анализа данных по копийности генов использовали алгоритмы GISTIC 2.0, MutSig и RAE [10, 14, 15]. С использованием указанных алгоритмов было подобрано 34 гена (*CYP1-A1, -A2, -B1, CYP19A, ESR1/2, GPER, STS, SULT1-A, -E1, BAX, BCL-2, TP-53, MDM2, CASP-9, CASP-3, CASP-7, CASP-8, PRKCI, SOX2, OCT4, PIK3, PTEN, CMYC, SOX18, AKT1, NOTCH1, BRCA1/2, EXO1, SCNN1A, KRAS, EGFR и BRAF*), показатель копийности которых можно использовать в качестве маркеров серозной аденокарциномы яичников.

Показатель копийности генетических локусов в опухолевых клетках больных серозной аденокарциномой яичника. *Вариации в числе копий генов* (Copy Number Variation (CNV)) — вид генетического полиморфизма, результатом которого является уменьшение или увеличение количества копий определенного гена, а следовательно, снижение или увеличение экспрессии продукта этого гена [9]. Показатель CNV может рассматривать как высокоспецифичный и высокочувствительный биологический маркер, подходящий и для ранней диагностики, и для молекулярного типирования опухолей. Также исследование вариации показателя копийности генететических локусов может раскрыть механизмы, лежащие в основе развития и прогрессирования серозной аденокарциномы яичников. Исходя из этого, анализ показателя копийности генетических локусов, регулирующих апоптоз, репарацию ДНК, клеточную пролиферацию, метаболизм и рецепцию эстрогенов в опухолевых и нормальных клетках серозной аденокарциномы яичников высокой (hgSC) и низкой степени (lgSC) злокачественности, является актуальным направлением, и ему посвящен данный раздел работы.

В выборке (200 пациенток: 104 пациентки с lgSC, 96 пациенток с hgSC) обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генов *PIK3CA* и *BCL2* в 2,0 раза и 4,2 раза соответственно, а также снижение копийности *BAX, CASP3* и *CASP8* в 2,0; 1,7 и 1,7 раза соответственно в опухолевых клетках относительно нормальных клеток яичника (рис. 6А).

На рисунке 6Б, где представлена тепловая карта, совмещенная с кластерным анализом, показаны данные по копийности 34 генетических локусов у 200 больных серозным раком яичников. Эти данные свидетельствуют о значительной гетерогенности показателя копийности у этих больных. Проведенный кластерный анализ разделил имеющуюся выборку ($n = 200$) на две, соответствующие двум гистологическим подтипам: высокой (кластер 1, $n = 96$) и низкой (кластер 2, $n = 104$) степени злокачественности (рис. 6Б и 6Г). Данные кластеры статистически значимо отличались по копийности генов ($p < 0.005$): в кластере 1 была повышена копийность *MDM2*, *SOX2*, *ESR1*, *CYP1-B1* и *SULT1-E1* в 3,4; 5,3; 4,2; 4,0 и 2,9 раза соответственно и снижена копийность *TP53* и *BRCA2* в 2,0 и 2,5 раза соответственно; в кластере 2 была повышена копийность *PIK3CA*, *PTEN* и *BCL2* в 2,5; 2,5 и 4,7 раза соответственно и снижена копийность *BAX*, *CASP3* и *CASP8* в 2,5; 2,0 и 2,0 раза соответственно в опухолевых клетках яичника относительно нормальных. При этом число копий *PIK3CA, PTEN* и *BCL2* в 2,4; 2,6 и 3,9 раза соответственно было выше ($p < 0,05$), а *BAX, MDM2, CYP1B, ESR1, SULT1E1* и *SOX2* в 2,3; 2,7; 3,8; 3,3; 2,0 и 4,0 раза соответственно ниже ($p < 0,05$) в опухолевых клетках серозной аденокарциномы низкой степени злокачественности по сравнению с опухолевыми клетками серозной аденокарциномы высокой степени злокачественности (рис. 6В).

Также при проведении кластерного анализа удалось выделить несколько подгрупп в двух основных кластерах: в кластере 1 — три подгруппы ($n_{1к-1} = 20$, $n_{1к-2} = 41$, $n_{1к-3} = 35$), а в кластере 2 — четыре подгруппы ($n_{2к-1} = 21$, $n_{2к-2} = 30$, $n_{2к-3} = 29$, $n_{2к-4} = 24$) (рис. 6Б). Подгруппы первого кластера статистически значимо ($p < 0,05$) отличались по копийности генов *SULT1-E1* (1 и 3 подгруппа) и *SOX2.* Так копийность *SULT1E1* на 40 % ($p < 0,05$) была выше в опухолевых клетках подгруппы 3 по сравнению с подгруппой 1. Копийность *SOX2* в опухолевых клетках



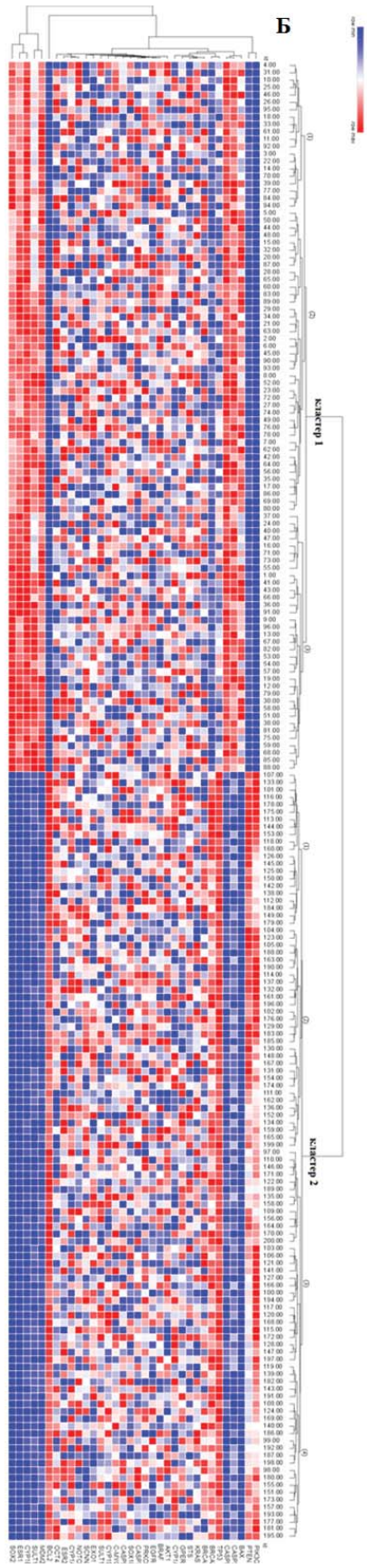


Рис. 6. *Молекулярно-генетические характеристики серозной аденокарциномы яичника. А — кратность изменения копийности генетических локусов в опухолевых клетках серозной аденокарциномы относительно нормальных клеток яичников (n = 200; * — статистически значимые отличия, p < 0,05). Б — тепловая карта, визуализирующая гетерогенность показателя копийности генов в опухолевых клетках и результаты кластерного анализа. В — показатели копийности генов в двух кластерах (n = 96 и 104 соответственно), * — статистически значимые отличия копийности в опухолевых клетках относительно нормальных, p < 0,05; * — статистически значимые отличия копийности генов в кластере 1 и 2, p < 0,05); Г — профиль копийности генов, отражающий гетерогенность выборки и ее подразделение на подгруппы.*

подгруппы 1 была на 10 % выше ($p < 0,05$), чем в подгруппе 2, а в подгруппе 2 — на 20 % ниже ($p < 0,05$), чем в подгруппе 3 (рис. 7А). Подгруппы 1, 3 и 4 кластера 2 отличались по копийности гена *PTEN,* а подгруппа 1 и 2 — по копийности гена *BCL2.*

В опухолевых клетках больных серозной аденокарциномы кластера 2 подгруппы 1 копийность *PTEN* была выше на 40 % ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем копийности этого гена в подгруппах 3 и 4, а копийность *BCL2* на 16 % ($p < 0,05$) выше по сравнению с уровнем копийности этого гена в подгруппе 2 (рис. 7Б).

Применение алгоритма FMD позволило сгруппировать перечень всех исследуемых генов в пять функциональных модулей, связанных с регуляцией следующих ключевых сигнальных путей: метаболизма стероидных гормонов, апоптоза и клеточного цикла, метаболизма липидов, ответа на радиационное облучение и репарации ДНК, пролиферации и дифференцировки, клеточного ответа на гипоксию, канонического Wnt-сигнального пути, посттранскрипционного сайленсинга генов, миграции эпителиальных клеток и клеточного ответа на циклические органические соединения (рис. 8).

Из представленной схемы видно, что для каждого гистологического подтипа серозной аденокарциномы яичника (высокой (кластер 1, n = 96) и низкой (кластер 2, n = 104) степени злокачественности) изменение копийности генов (дифференциальное для этих двух групп) будет приводить к различным изменениям в сигнальных каскадах.

Анализ вариации числа копий генов, ответственных за регуляцию апоптоза, пролиферацию, дифференцировку клеток, репарацию повреждений ДНК, рецепцию и метаболизм эстрогенов в нормальных и опухолевых клетках яичников позволил установить наиболее характерные молекулярные маркеры клеток серозной аденокарциномы яичника — показатель копийности генетических локусов *BCL2, BAX, CASP-3, CASP-8* и *PIK3CA*. На основании

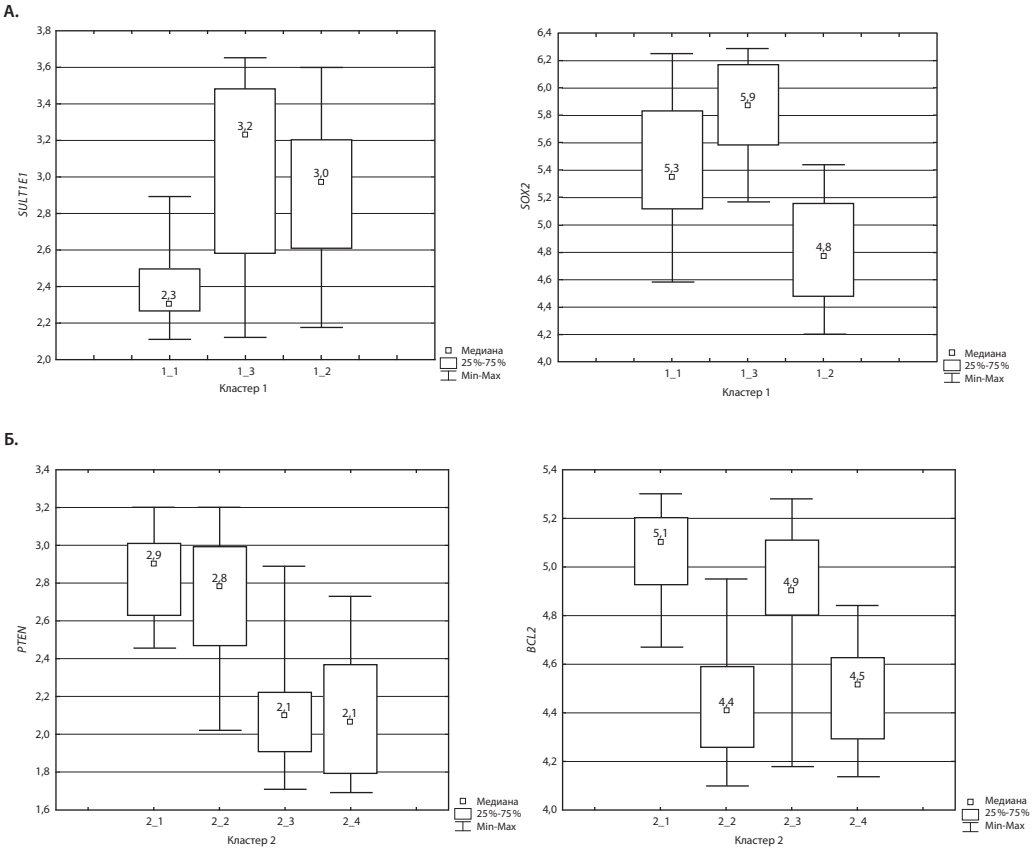
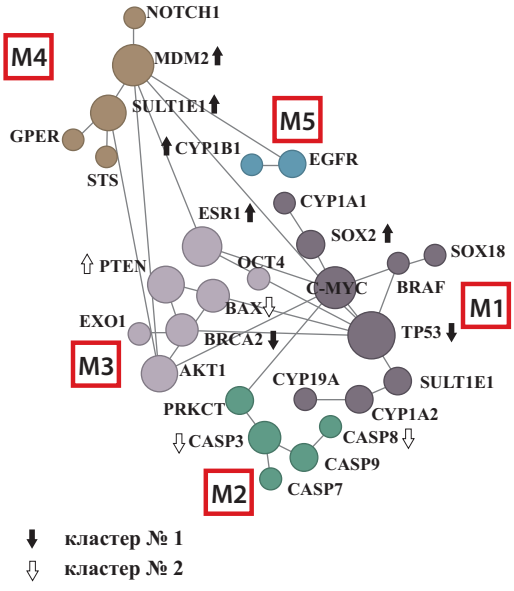


Рис. 7. *Особенности показателя копийности генетических локусов в подгруппах кластера 1 (А) и кластера 2 (Б). Представлены статистически значимые отличия ($p < 0,05$), использован критерий Краскела-Уоллиса*



Модуль	Ключевые сигнальные пути	Q value
	метаболизм стероидов (гормонов)	0,00002
	регуляция клеточного цикла/апоптоза	0,00024
	катаболизм липидов	0,00030
M1	ответ на радиацию	0,00063
	регуляция пролиферации	0,00119
	клеточный ответ на гипоксию	0,00230
	канонический Wnt сигнальный путь	0,00520
M2	эффекторная фаза апоптоза	0,00001
	клеточная дифференцировка	0,00230
	негативная регуляция посттранскрипционного сайленсинга генов	0,00020
	положительная регуляция активности транскрипционных факторов	0,00039
	положительная регуляция апоптоза	0,00050
M3	регуляция клеточной пролиферации	0,00155
	регуляция перехода между фазами клеточного цикла	0,00394
	миграция эпителиальных клеток	0,00496
	репарация ДНК	0,00661
M4	положительная регуляция ERK1 / ERK2 каскадов	0,00173
	регуляция клеточного цикла	0,00230
M5	клеточный ответ на циклические органические соединения	0,00155

Рис. 8. *Группировка генетических локусов, ассоциированных с развитием опухолей яичников, по функциональным модулям. Отмечены гены, статистически значимо изменяющие уровень копийности, дифференциально для кластера 1 и 2.*

отличий по уровню копийности генов было выделено два молекулярно-генетических подтипа серозной аденокарциномы, соответствующих двум гистологическим подтипам — высокой (*MDM2, SOX2, ESR1, CYP1-B1, SULT1-E1, TP-53, BRCA2*) и низкой (*PIK3CA, PTEN, BCL2, BAX, CASP-3, CASP-8*) степени злокачественности. Эти подтипы также обладали молекулярной гетерогенностью, что позволило разделить каждый из них на несколько подгрупп: для серозной аденокарциномы высокой степени злокачественности — три подгруппы, а для серозной аденокарциномы низкой степени злокачественности — четыре подгруппы. Полученные данные расширяют представления о молекулярных механизмах канцерогенеза яичников, подтверждают молекулярно-генетические различия между двумя гистологическими подтипами серозной аденокарциномы, лежащие в основе их различного клинического течения.

Выживаемость больных с различными молекулярными подтипами серозной аденокарциномы. Сравнение уровней кумулятивной выживаемости в группах пациенток различного возраста показало, что через год у женщин моложе 55 лет значение этого показателя было на уровне 69,6 %, а у женщин в возрасте 55 лет и старше было на уровне 58,1 % (рис. 9).

Через два года этот показатель у больных в возрасте до 55 лет и старше 55 лет составлял соответственно 52,2 и 41,9 %, а трехлетняя выживаемость снизилась соответственно до 30,4 и 23,3 %. Во все сроки значимых межгрупповых (по возрасту) отличий по уровню выживаемости отмечено не было, значение F-критерия Кокса составило 1.155 ($p = 0,248$).

На рисунке 9 также представлены кривые Каплана-Мейера общей выживаемости больных серозной аденокарциномой яичников с учетом молекулярного и гистологического подтипа.

Анализ динамики показателя кумулятивной выживаемости в группах пациенток в зависимости от молекулярно-генетического и гистологического типа опухолей показал, что выживаемость в течение 12 месяцев при lgSC была на уровне 78,6 %, тогда как при hgSC значение этого показателя было статистически заметно ниже ($p < 0,05$) и составляло 57,7 % (рис. 9). При оценке двухгодичной выживаемости выявленное соотношение значений кумулятивной выживаемости сохранялось, их уровни составили через два года 64,3 и 40,4 % соответственно в группах с lgSC и hgSC. Трехгодичная выживаемость в этих группах составила 46,4 и 20,2 % соответственно, то есть у пациенток

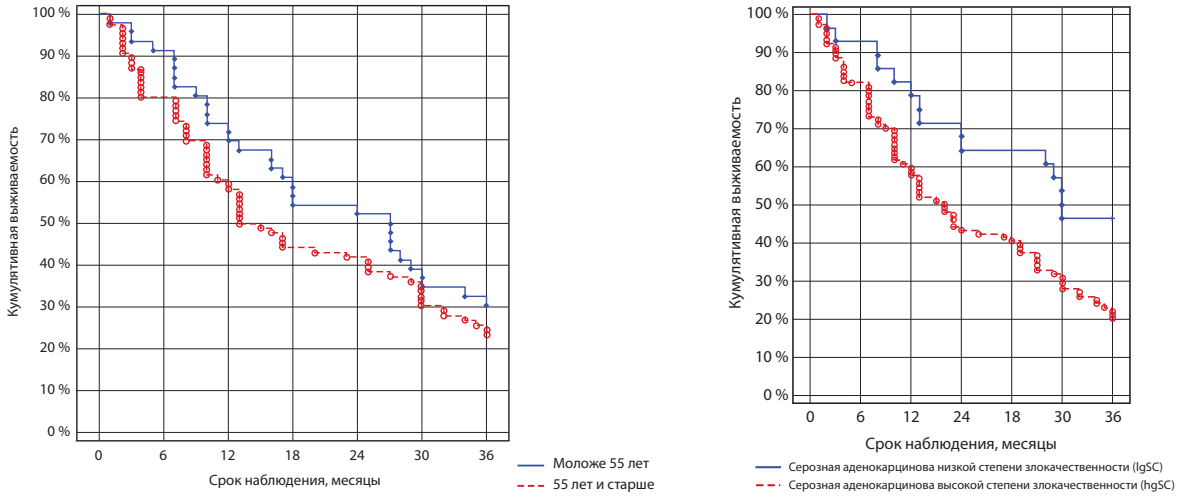


Рис. 9. *Выживаемость у больных серозной аденокарциномой яичника в зависимости от возраста и степени злокачественности опухоли*

с hgSC уровень показателя был ниже в 2,3 раза ($p < 0,05$), чем в группе lgSC. При этом отмечены статистически значимые межгрупповые отличия выживаемости в этих группах больных (F-критерий Кокса = 2,34; $p = 0,02$).

Как было показано в предыдущем разделе, кластерный анализ выделил несколько подгрупп в двух основных кластерах: в кластере 1 (hgSC) — три подгруппы ($n_{1к-1} = 20$, $n_{1к-2} = 41$, $n_{1к-3} = 35$), а в кластере 2 (lgSC) — четыре подгруппы ($n_{2к-1} = 21$, $n_{2к-2} = 30$, $n_{2к-3} = 29$, $n_{2к-4} = 24$).

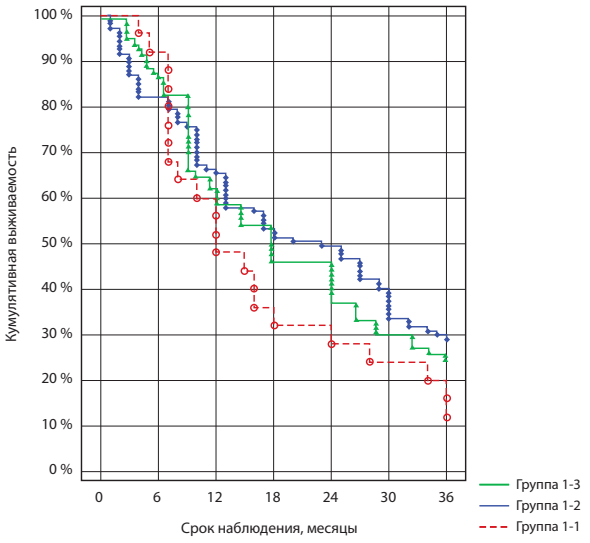
Оценка выживаемости в кластере 1 (hgSC) пациенток в зависимости от подгруппы $n_{1к-1} = 20$, $n_{1к-2} = 41$ или $n_{1к-3} = 35$ выявила, что выживаемость в течение 12 месяцев в подгруппе 1 больных была на уровне 48,0 %, в то время как в подгруппе 2 значение этого показателя было статистически значимо ($p < 0,05$) в 1,4 раза выше и составляла 65,4 %, а в подгруппе 3 выживаемость была на уровне 58,1 % и статистически значимо не отличалась от подгрупп 1 и 2 (рис. 10).

Через два года выявленное соотношение значений кумулятивной выживаемости практически не изменилось, их уровни составили 49,5; 36,4 и 28,0 % соответственно в подгруппах 2, 3 и 1 (т. е. в 12 мес. соотношение было 1.4:1.2:1, а стало 1.8:1.3:1). При этом показатели между выживаемостью пациенток в 1-й и 2-й подгруппах hgSC статистически значимо различались в 1,8 раза (F-критерий Кокса = 2,37; $p < 0,02$) (рис. 10).

Трехгодичная выживаемость в этих подгруппах была соответственно на уровне 28,9, 25,2 и 12,0 % (Рис. 10). При этом отмечены статистически значимые межгрупповые отличия в выживаемости в этих подгруппах больных РЯ: между подгруппами 2 и 1 различие было в 2,4 раза (F-критерий Кокса = 1,97, $p < 0,03$), а между подгруппами 3 и 1 различие было в 2,1 раза (F-критерий Кокса = 2,02, $p < 0,03$).

Оценка выживаемости в кластере 2 (lgSC) пациенток в зависимости от подгруппы $n_{2к-1} = 21$, $n_{2к-2} = 30$, $n_{2к-3} = 29$ или $n_{2к-4} = 24$ выявила, что выживаемость в течение 12 месяцев в подгруппе 1 больных была на уровне 93,0 %, в подгруппе 2 — 90,1 %, в подгруппе 3 — 57,8 %, а в подгруппе 4 была на уровне 82,6 %. При этом выживаемость в подгруппе 3 статистически значимо ($p < 0,05$) отличалась от подгрупп 1, 2 и 4 в 1,6; 1,6 и 1,4 раза соответственно (рис. 11).

В дальнейшем наблюдалось постепенное снижение значения показателя кумулятивной выживаемости в этих подгруппах. Через 24 месяца значения этого показателя были 63,7; 75,3; 42,2 и 60,9 % в подгруппах 1, 2, 3 и 4 соответственно. При этом выживаемость в подгруппе 3 статистически значимо (F-критерий Кокса составил 2.87 ($p = 0,038$)) отличалась от этого показателя в подгруппе 2 в 1,8 раза (рис. 11).



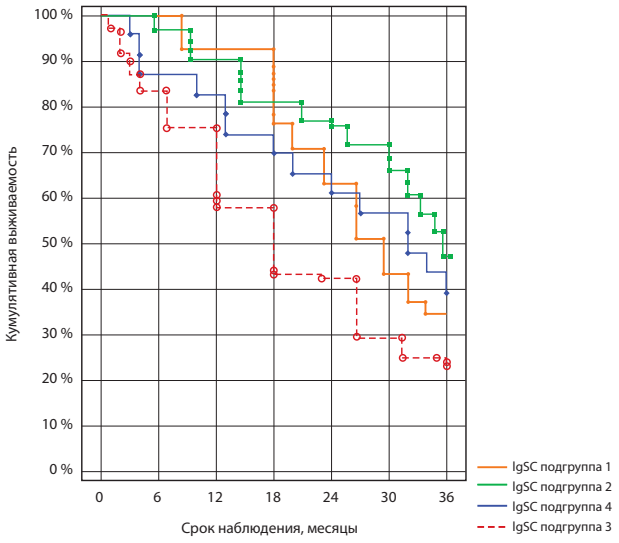


Рис. 10. *Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости больных серозной аденокарциномой яичника высокой степени злокачественности (кластер 1, n = 96) отдельно по трем группам, статистически значимо (p < 0,05) различающимся по копийности генов SULT1E1 и SOX2, а также низкой степени злокачественности (кластер 2, n = 104) отдельно по 4 группам, статистически значимо (p < 0,05) различающимся по копийности генов PTEN и BCL2.*

Трехгодичная выживаемость в этих подгруппах (1–4) была соответственно на уровне 35,9; 47,2; 24,3 и 39,7 %. При этом отмечено статистически значимое межгрупповое отличие в выживаемости больных РЯ между подгруппами 2 и 3 — в 1,9 раза (F-критерий Кокса = 1,62, p < 0,02).

Таким образом, было установлено, что два основных подтипа серозной аденокарциномы яичника (высокой и низкой степени злокачественности) существенно отличаются по такому показателю, как общая выживаемость, что не противоречит литературным данным. Однако важно отметить, что каждый из этих подтипов обладает внутригрупповой молекулярно-генетической гетерогенностью, которая позволила выделить в каждом из них дополнительные подгруппы, также отличающиеся по выживаемости пациенток. Обобщенные данные представлены в таблице 3.

Как видно из представленных в таблице 3 данных, в кластере больных серозной аденокарциномой яичника низкой степени злокачественности наихудшими показателями выживаемости характеризовались пациентки 3-й подгруппы (агрессивный подтип), а наилучшими показателями обладали подгруппы 1, 2 и 4 (благоприятный подтип). В кластере больных серозной аденокарциномой яичника высокой степени злокачественности наихудшими пока-

Таблица 3

Общая выживаемость больных РЯ в зависимости от молекулярных типов и субтипов опухоли

Серозная аденокарцинома яичника						
Низкой степени злокачественности, %				Высокой степени злокачественности, %		
12 мес. — 78,6 24 мес. — 64,3 36 мес. — 46,4				12 мес. — 57,7 24 мес. — 40,4 36 мес. — 20,2		
Выживаемость в подгруппах, %				Выживаемость в подгруппах, %		
1	2	3	4	1	2	3
12 мес. — 93,0 24 мес. — 63,7 36 мес. — 35,9	12 мес. — 90,1 24 мес. — 75,3 36 мес. — 47,2	12 мес. — 57,8 24 мес. — 42,2 36 мес. — 24,3	12 мес. — 82,6 24 мес. — 60,9 36 мес. — 39,7	12 мес. — 48,0 24 мес. — 28,0 36 мес. — 12,0	12 мес. — 65,4 24 мес. — 49,5 36 мес. — 28,9	12 мес. — 58,1 24 мес. — 36,4 36 мес. — 25,2

зателями выживаемости характеризовались пациентки 1-й подгруппы (высокоагрессивный подтип), а наилучшими показателями обладали подгруппы 2 и 3 (не агрессивный подтип).

Следующим этапом целесообразно оценить влияние копийности рассматриваемых генов на установленные показатели выживаемости.

Нами было показано, что 13 генетических локусов (*BAX*, *BCL2, CASP-3*, *CASP-8, MDM2, TP53, PIK3CA, SOX2, BRCA2, PTEN, ESR1, CYP1-B1* и *SULT1-E1*) могут быть использованы для молекулярного типирования серозной аденокарциномы яичников. С использованием однофакторного регрессионного анализа Кокса было оценено влияние этих генов на выживаемость. На общую выживаемость влияла копийность только 4 генов — *SOX2* (p = 0,01), *SULT1E1* (p = 0,03), *BCL2* (p = 0,02) и *PTEN* (p = 0,04).

В таблице 4 представлены результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса.

Регрессионный анализ показал наличие статистически значимого влияния аберрантной копийности генов *SOX2* (↑) *и SULT1-E1* (↓) в опухолевой ткани на риск летального исхода у больных серозной аденокарциномой яичника высокой степени злокачественности 1 подгруппы. Также результаты регрессионного анализа позволили обнаружить статистически значимое (p < 0,02) влияние уровня копийности генетических локусов *BCL2* и *PTEN* в опухолевой ткани на риск развития летального исхода у больных серозной аденокарциномой яичника низкой степени злокачественности 1–4-х подгрупп.

Обсуждение результатов исследования

В ходе проведенного исследования было установлено, что для каждого гистологического подтипа серозной аденокарциномы яичника изменение копийности генов будет приводить к различным изменениям в сигнальных каскадах. Так, например, снижение копийности про-апоптозных генов *BAX*, *CASP-3* и *CASP-8* в совокупности с увеличением копийности анти-апоптозного гена *BCL2,* а также генов-регуляторов пролиферации и миграции клеток *PTEN* и *PIK3CA* может приводить к нарушению регуляции клеточного цикла и к бесконтрольной пролиферации клеток в опухолевой ткани при серозной аденокарциноме яичников низкой степени злокачественности (кластер 2, n = 104). Аналогичный биологический эффект может развиться и в опухолевых

Таблица 4

Влияние уровня копийности генетических локусов на общую выживаемость больных (регрессионный анализ Кокса)

Ген	B (s)	ОШ	Wald	p
SOX2	3,85 (1,66)	7,1	4,47	**0,01**
SULT1E1	5,99 (2,56)	7,7	5,21	**0,03**
BCL2	–1,99 (0,99)	0,2	6,55	**0,02**
PTEN	3,15 (1,24)	3,9	6,41	**0,04**
MDM2	4,88 (2,06)	10,1	3,82	0,05
ESR1	4,33 (2,01)	9,8	3,80	0,06
CYP1B1	2,45 (1,12)	2,1	3,01	0,07
TP53	2,85 (1,42)	2,7	2,71	0,09
BRCA2	3,60 (2,57)	2,9	3,14	0,11
PIK3CA	7,01 (4,99)	6,1	4,11	0,18
BAX	7,10 (3,40)	5,13	2,20	0,12
CASP3	8,25 (3,21)	6,78	4,01	0,21
CASP8	5,00 (4,10)	5,8	3,95	0,37

клетках серозной аденокарциномы яичника высокой степени злокачественности, но уже за счет изменения копийности генов *TP-53* и *MDM2*. То есть, в случае опухолей первого подтипа изменения затрагивают регуляцию митохондриального пути апоптоза (образование олигомерных пор в митохондриальной мембране под действием белка BAX приводит к формированию апаптосомы, а BAX, в свою очередь, ингибируется анти-апоптотическим белком BCL-2) и инициаторную (эффекторную) части каспазного каскада (CASP-8 и CASP-3 соответственно), а во втором случае изменения затрагивают регуляцию p53-зависимого пути апоптоза [16].

Увеличение копийности гена *MDM2* может приводить к росту количества продукта этого гена, который, в свою очередь, блокирует действие белка онкосупрессора *p53,* связываясь и убиквитинилируя его для последующей деградации протеасомой [17]. *TP53* также участвует в активации белков репарации ДНК при ее повреждении. Поэтому потеря определенного числа копий *TP53* и *BRCA2* может отрицательно сказываться на эффективности систем репарации ДНК в опухолевых клетках серозной аденокарциномы яичника высокой степени злокачественности. В клетках этих опухолей нами также обнаружено повышение копийности генетических локусов, ответственных за регуляцию рецепции и метаболизма эстрогенов (*ESR1, CYP1-B1* и *SULT1-E1*).

Хорошо известна важная роль гиперэстрогении в патогенезе данного заболевания. Повышенные концентрации эстрогенов стимулируют деление клеток, индуцируют синтез факторов роста и их рецепторов, в том числе эстрогенового рецептора первого типа (ESR1) [18]. Биологический эффект эстрогенов реализуется через их взаимодействие со специфическими рецепторами, активирующими гены-мишени во многих тканях. Так, во многих исследованиях доказано, что гиперэкспрессия *ESR1* наблюдается при онктрансформации во многих тканях [19]. K. Gajjar и соавторы [20] показали, что 4-гидрокси эстрогены (метаболиты цитохрома P450 1B1, кодируемого геном *CYP1B1*) участвуют в онкотрансформации разных тканей, при этом наблюдается гиперэкспрессия *CYP1B1,* зависящая от уровня копийности этого гена.

Таким образом, было показано, что 13 генов (*BAX*, *BCL2, CASP-3*, *CASP-8, MDM2, TP53, PIK3CA, SOX2, BRCA2, PTEN, ESR1, CYP1-B1 и SULT1-E1*) могут быть использованы для молекулярного типирования серозной аденокарциномы яичников. С использованием однофакторного регрессионного анализа Кокса было показано, что на общую выживаемость влияла копийность четырех генов — *SOX2, SULT1E1, BCL2* и *PTEN*.

Ген *SULT1E1* кодирует фермент эстроген-сульфотрансферазу, которая катализирует сульфатную конъюгацию многих гормонов, нейромедиаторов, лекарств и ксенобиотических соединений. Эстроген-сульфотрансфераза передает сульфогруппу эстрогена, что может регулировать уровни его рецепторов. Согласно теории эстроген-ассоциированного канцерогенеза, увеличение количества ядерных рецепторов ERб приводит к активации пролиферативных процессов в тканях-мишенях и развитию опухолей [21]. Этот процесс блокируется увеличением активности фермента сульфотрансферазы, ассоциированным с повышенной копийностью гена *SULT1-E1*. Сульфотрансфераза участвует в инактивации эстрогенов путем их сульфатирования [21].

Ген *SOX2* (SRY-box 2) кодирует транскрипционный фактор, необходимый для поддержания самообновления или плюрипотентности недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. В клетках опухолей разных нозологий наблюдаются изменения копийности генетических локусов в области 3q26.3, где и локализуется ген *SOX2.* Sox2 контролирует морфогенез и дифференцировку эпителиальных клеток. В нормальных условиях ген и белок Sox2 выполняют важные функции в поддержании определенной пропорции базальных клеток в эпителии и их самообновлении. Но гиперэкспрессия данного гена, ассоциированная с увеличением числа его копий, может приводить к обширной эпителиальной гиперплазии и раку [22], а также активации клеточной миграции [23]. Гиперэкспрессия *SOX2* обнаружена

при злокачественных опухолях простаты [24], толстой кишки [25] и глиобластоме [26, 27].

Соответственно, у больных кластера 1 (hgSC) подгруппы 1 медиана копийности гена *SULT1E1* была ниже этого показателя в двух других подгруппах, а медиана копийности гена *SOX2* имела промежуточное значение среди двух других подгрупп, но при этом превышала этот показатель в нормальной ткани яичников более, чем в пять раз. Очевидно, сочетание этих двух факторов и обеспечило клинические особенности течения заболевания у пациенток этой подгруппы.

Также было обнаружено, что наихудшие показатели выживаемости наблюдались у больных серозной аденокарциномой яичника низкой степени злокачественности 3-й подгруппы (подтипа). В этом подтипе наблюдалось сочетание одновременно наименьшей медианы копийности гена *PTEN* и наибольшей копийности гена *BCL2*.

Субстратами фосфатазы, кодируемой генетическим локусом *PTEN,* являются и белки, и фосфатидилинозитол-3-фосфаты. Данная фосфатаза катализирует отщепление PO_4-группы фосфатидилинозитол-3-фосфатов, лишая их функции вторичных мессенджеров. PTEN является антионкобелком, негативным регулятором PI3K/AKT/mTOR-сигнального пути [28]. В нормальных клетках белок PTEN контролирует пролиферацию клеток и внедрение в соседние ткани. В экспериментальной работе Zi-Jian Lan и соавторов показано, что уменьшение функциональных копий этого гена приводит к избытку андрогенов и дисфункции яичников у лабораторных мышей [29].

Белок PTEN также является одним из опухолевых супрессоров, наиболее часто теряющих свою функциональную активность при раке у человека. По предварительным оценкам, до 70 % больных раком простаты имеют сниженную копийность гена *PTEN* [30]. Ряд исследований выявили повышенную частоту потери копии гена *PTEN* в опухолях, что потенциально отражает увеличение пролиферации и плотности клеток в этих опухолях [31].

При канцерогенезе могут происходить мутации или потери определенного количества копий гена *PTEN*, которые инактивируют или снижают его ферментативную активность, что в итоге приводит к увеличению пролиферации клеток. Повышенная инактивация гена *PTEN* наблюдается при глиобластоме, раке эндометрия и раке простаты; а пониженная экспрессия обнаруживается в опухолях легких и молочных желез [30].

Ген *BCL2* (B-cell lymphoma 2) кодирует регуляторный белок из семейства Bcl-2, который ингибирует клеточную гибель (апоптоз), изменяя проницаемость митохондриальной мембраны и предотвращая выход цитохрома С из митохондрий, что оказывает ингибирующее действие каспазы [16]. Рак можно рассматривать как нарушение баланса между пролиферацией и гибелью клеток. Чрезмерная экспрессия антиапоптотических генов и недостаточная экспрессия проапоптотических генов могут привести к отсутствию гибели клеток, характерной для рака. Наглядным примером служат лимфомы. Сверхэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 в лимфоцитах сама по себе не вызывает опухоли, но одновременная сверхэкспрессия Bcl-2 и протоонкогена myc может вызывать агрессивные В-клеточные злокачественные новообразования. Гиперэкспрессия *BCL2*, ассоциированная с его повышенной копийностью, часто встречается и при других видах рака, например, при раке легкого и раке яичников [32]. Соответственно, больные раком яичника с одновременно наиболее сниженной копийностью гена *PTEN* и повышенной копийностью гена *BCL2* в опухолевой ткани потенциально должны обладать наименьшим показателем выживаемости. Это и наблюдается при сравнении 3-го подтипа и 1-го, 2-го и 4-го подтипов серозной аденокарциномы яичника низкой степени злокачественности.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило не только выделить на молекулярно-генетическом уровне подтипы серозной аденокарциномы яичников низкой и высокой степени злокачественности, но и выявить особенности их клинического течения. Полученные результаты открывают большие перспективы для персонифицированного подхода к лечению этих опухолей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Амлаев К. Р., Гейвандова М. Г., Хорошилова Е. Ю.* Доступность качественной онкологической помощи в условиях города // Социология города. 2015. № 3. С.47–52.

2. *Цандекова М. Р., Порханова Н. В., Кутилин Д. С.* Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 1.; URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id = 29428

3. *Оганесян М. Г.* Онкологическая заболеваемость как проблемы социальной медицины // Современные исследования социальных проблем (электронный научный журнал). 2015. № 1 (45). С. 533–554.

4. *Кислякова Ю. В., Максимова А. А.* Организация онкологической помощи населению (на примере Саратовской области): проблемы и пути совершенствования // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2015. Т. 5, № 12. С. 1719.

5. *Khattak Y. J., Hafeez S., Alam T.* et al. Ovarian masses: Is multi-detector computed tomography a reliable imaging modality? // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013. Vol. 14. P. 2627–2630.

6. *Цандекова М. Р., Порханова Н. В., Кит О. И., Кутилин Д. С.* Малоинвазивная молекулярная диагностика серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности. Онкогинекология. 2021. № 4. С. 35–49.

7. *Kurman R. J.* Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. Ann. Oncol. 2013. vol. 24. P.16–21.

8. *Kurman R. J., Shih I. M.* The dualistic model of ovarian carcinogenesis: Revisited, revised, and expanded. Am. J. Pathol. 2016. vol.186. P. 733–747.

9. *Кутилин Д. С., Айрапетова Т. Г., Анистратов П. А., Пыльцин С. П., Лейман И. А., Карнаухов Н. С., Кит О. И.* Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой легкого. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 6. С. 731–738

10. *Gao J., Aksoy B. A., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer S. O., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E., Cerami E., Sander C., Schultz N.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013;6(269):pl1

11. *Колесников Е. Н., Максимов А. Ю., Кит О. И., Кутилин Д. С.* Зависимость общей и без рецидивной выживаемости больных от молекулярно-генетического подтипа плоскоклеточного рака пищевода // Вопросы онкологии. 2019. 65(5). С. 691–700.

12. *Кутилин Д. С.* Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // Молекулярная биология. 2020. Т. 54. № 4. С. 580–595.

13. *Димитриади Т. А., Бурцев Д. В., Дженкова Е. А., Кутилин Д. С.* Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести. Успехи молекулярной онкологии. 2020;7(2). С.30–44.

14. *Beroukhim R., Getz G., Nghiemphu L., Barretina J., Hsueh T., Linhart D., Vivanco I., Lee J C., Huang J H., Alexander S., Du J., Kau T., Thomas R K., Shah K., Soto H., Perner S., Prensner J., Debiasi R M., Demichelis F., Hatton C., Rubin M A., Garraway L A., Nelson S F., Liau L., Mischel P S., Cloughesy T F., Meyerson M., Golub T A., Lander E S., Mellinghoff I K., Sellers WR*. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(50):20007–12/

15. *Taylor BS., Barretina J., Socci ND., Decarolis P., Ladanyi M., Meyerson M., Singer S., Sander C.* Functional copy-number alterations in cancer. PLoS One. 2008;3(9):e3179/

16. *Кутилин Д. С., Гусарева М. А., Кошелева Н. Г., Габричидзе П. Н., Донцов В. А., Легостаев В. М., Шляхова О. В., Лиман Н. А., Солнцева А. А., Крохмаль Ю. Н.* Аберрантная транскрипционная активность генов как фактор радиорезистентности клеток линии HT-29 // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 3; URL: http://science-education.ru/ru/article/view?id = 29831

17. *Кутилин Д. С., Айрапетова Т. Г., Анистратов П. А., Пыльцин С. П., Лейман И. А., Чубарян А. В., Туркин И. Н., Водолажский Д. И., Николаева Н. В., Лысенко И. Б.* Изменение относительной копийности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2017. № 3–2 (195–2). С. 74–82.

18. *Katzenellenbogen B. S.* Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways // Biol. reproduction. 2001. Vol. 54. P. 287–293.

19. *He J., Chang W., Feng C., Cui M., Xu T.* Endometriosis Malignant Transformation: Epigenetics as a Probable Mechanism in Ovarian Tumorigenesis // Int J Genomics. 2018. 2018(1). P. 1–13.

20. *Gajjar K., Martin-Hirsch P. L., Martin F. L.* CYP1B1 and hormone-induced cancer // Cancer Lett. 2012. 324(1). P. 13–30

21. *Кит О. И., Водолажский Д. И., Кутилин Д. С., Никитин И. С., Моисеенко Т. И., Франциянц Е. М.* Транскриптомная активность эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2016. № 115. С. 294–304

22. *Lu Y., Futtner C., Rock J R., Xu X., Whitworth W., Hogan B L., Onaitis M. W.* (2010). «Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung». PLOS ONE. 5 (6): e11022.

23. *Hussenet T., Dali S., Exinger J., Monga B., Jost B., Dembelé D., Martinet N., Thibault C., Huelsken J., Brambilla E., du Manoir S.* (2010). «SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas». PLOS ONE. 5 (1): e8960.

24. *Kregel S., Kiriluk K J., Rosen A M., Cai Y., Reyes E E., Otto K B., Tom W., Paner G P., Szmulewitz R Z., Vander Griend DJ* (2013). «Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer». PLOS ONE. 8 (1): e53701.

25. *Tani Y., Akiyama Y., Fukamachi H., Yanagihara K., Yuasa Y* (April 2007). «Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression». Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 133 (4): 263–9

26. *Ikushima H., Todo T., Ino Y., Takahashi M., Miyazawa K., Miyazono K.* Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. Cell Stem Cell. 2009 Nov 6;5(5):504–14

27. Gangemi, Rosaria Maria Rita; Griffero, Fabrizio; Marubbi, Daniela; Perera, Marzia; Capra, Maria Cristina; Malatesta, Paolo; Ravetti, Gian Luigi; Zona, Gian Luigi; Daga, Antonio (25 October 2008). «SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity». Stem Cells. 27 (1): 40–48.

28. *McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Montalto G., Cervello M., Nicoletti F., Fagone P., Malaponte G., Mazzarino M. C., Candido S., Libra M., Bäsecke J., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Milella M., Tafuri A., Cocco L., Evangelisti C., Chiarini F., Martelli A. M.* Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response // Oncotarget. 2012. T. 3(9). P. 954–987.

29. *Zi-Jian Lan, M. S. Krause, S. D. Redding, X. Li, G. Z. Wu.* Selective deletion of Pten in theca-interstitial cells leads to androgen excess and ovarian dysfunction in mice // Molecular and Cellular Endocrinology. 2017–03–15. T. 444. C. 26–37.

30. *Chen Z., Trotman L C., Shaffer D., Lin H K., Dotan Z A., Niki M., Koutcher J A., Scher H I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., Pandolfi P. P.* (August 2005). «Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis». Nature. 436 (7051): 725–30.

31. Norris, Joseph M.; Simpson, Benjamin S.; Parry, Marina A.; Allen, Clare; Ball, Rhys; Freeman, Alex; Kelly, Daniel; Kim, Hyung L.; Kirkham, Alex; You, Sungyong; Kasivisvanathan, Veeru (2020–07–01). «Genetic Landscape of Prostate Cancer Conspicuity on Multiparametric Magnetic Resonance Imaging: A Systematic Review and Bioinformatic Analysis». European Urology Open Science. 20: 37–47.

32. *Otake Y., Soundararajan S., Sengupta T K., Kio E A., Smith J C., Pineda-Roman M., Stuart R K., Spicer E K., Fernandes D. J.* (April 2007). «Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA». Blood. 109 (7): 3069–75.

АВТОРЫ

Цандекова Мариэтта Рафаэловна, врач-онколог ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» МЗ Краснодарского края, 350051, г. Краснодар, ул. Димитрова, 146 e-mail: tsandekovamari@mail.ru

Tsandekova Marietta R., oncologist, Clinical Oncological Dispensary No. 1, Ministry of Health of the Krasnodar Territory, 350051, Krasnodar, st. Dimitrova 146, e-mail: tsandekovamari@mail.ru

Порханова Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, доцент кафедры онкологии ФГБОУ ВО КубГМУ, г. Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4А, e-mail: Porhanova.nat@mail.ru

Porkhanova Natalya V., Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Oncology, KubSMU, Krasnodar, st. Mitrofan Sedin 4A, e-mail: Porhanova.nat@mail.ru

Кутилин Денис Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 14 линия 63, г. Ростов-на-Дону, 344037; ORCID 0000-0002-8942-3733, e-mail: k.denees@yandex.ru

Kutilin Denis S., Ph.D., Leading Researcher Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre of Oncology, 14-th liniya, 63, Rostov-on-Don, 344037; ORCID 0000-0002-8942-3733, e-mail: k.denees@yandex.ru