

На правах рукописи

АСАДУЛЛИНА ДИЛАРА ДИНАРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНИТЕТА У
ПАЦИЕНТОВ СО СВЕТЛОКЛЕТОЧНЫМ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ**

1.5.7. – Генетика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2025

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный руководитель:

Гилязова Ирина Ришатовна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Любченко Людмила Николаевна,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующая отделом молекулярной генетики и
клеточных технологий Федерального
государственного бюджетного учреждения
«Национального медицинского
исследовательского центра Радиологии»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Глотов Олег Сергеевич, доктор
биологических наук, начальник Московского
геномного центра Государственного
бюджетного учреждения здравоохранения
города Москвы "Московский научно-
практический центр лабораторных
исследований Департамента здравоохранения
города Москвы"

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Медико-генетический
научный центр имени академика Н. П.
Бочкива», г. Москва

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «4» марта 2026 г. в «10.00 » часов на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференцзал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru>) и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru>).

Автореферат разослан «___» 20_г.

Ученый секретарь диссертационного совета
24.1.218.01 доктор биологических наук, доцент

Корытина Гульназ Фаритовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Почечно-клеточный рак (ПКР) представляет собой гетерогенную группу злокачественных карцином с различными гистологическими подтипами и относится к числу распространённых и высоколетальных онкологических заболеваний мочевыводящей системы.

Наиболее распространённым гистологическим подтипом является светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР). В 2022 году наибольшее количество случаев ПКР было зафиксировано в Китае, США и России (Kidney cancer statistics | World Cancer Research Fund). В 2024 году на территории Российской Федерации было выявлено более 22 000 новых случаев ПКР (Каприн с соавт., 2024).

В последние годы иммунотерапия с применением ингибиторов контрольных точек иммунитета (ИКТИ) продемонстрировала значительный клинический потенциал в лечении ряда онкологических заболеваний, в том числе ПКР, обеспечивая существенное улучшение исходов у части пациентов. Вместе с тем лишь незначительная доля больных достигает устойчивой эффективности и продолжительной выживаемости при лечении ИКТИ, что подчёркивает важность поиска надёжных биомаркеров для скрининга потенциальных пациентов для терапии и снижения риска чрезмерного лечения.

Для ряда опухолевых нозологий клинически валидированным биомаркером ответа на ИКТИ служат уровни экспрессии PD-L1, иммунная инфильтрация и опухолевая мутационная нагрузка. Однако при ПКР данные маркеры не обеспечивают надёжной стратификации пациентов по ответу на терапию и не являются клинически актуальными.

В настоящее время особый интерес в связи с иммунотерапией онкологических заболеваний вызывают микроРНК, в частности сети микроРНК, прямо и косвенно контролирующие экспрессию рецепторов иммунных контрольных точек. МикроРНК могут служить важнейшим компонентом биомаркерного ряда для прогнозирования эффективности ИКТИ; оценка их уровней в образцах плазмы до и после лечения представляет собой удобный и неинвазивный метод мониторинга терапевтического ответа. Экзосомальные микроРНК демонстрируют высокую стабильность и воспроизводимость, участвуют в межклеточной коммуникации, транспорте биомолекул и метастазировании, что делает их перспективными предикторами как чувствительности, так и резистентности к иммунотерапии ИКТИ.

Степень разработанности исследования

В последние годы некодирующие РНК приобрели статус центральных элементов эпигенетической регуляции генной экспрессии, а микроРНК (miRNAs) активно изучаются как ключевые регуляторы различных клеточных процессов в физиологических и патологических условиях. МикроРНК представляют собой короткие некодирующие РНК протяжённостью приблизительно 22 нуклеотида, функционирующие как посттранскрипционные модуляторы генной экспрессии. Их способность подавлять трансляцию онкогенов и генов-супрессоров опухолей указывает на важную роль в процессах злокачественной трансформации. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что микроРНК характеризуются стабильностью в плазме и сыворотке крови, тканевой специфичностью и значительным прогностическим потенциалом в качестве клинических биомаркеров (He et al., 2020).

Растущий объём данных свидетельствует о том, что экзосомальные микроРНК выступают

важными регуляторами опухолевых сигнальных путей и определяющими факторами опухолевого микроокружения. Дисрегуляция микроРНК способна воздействовать на иммуногенность злокачественных новообразований и терапевтический ответ на ИКТИ, что обуславливает их перспективность в качестве прогностических молекулярно-генетических маркеров.

Цель исследования

Поиск генетических маркеров эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета при светлоклеточном почечно-клеточном раке.

Задачи исследования

1. Провести анализ уровня экспрессии экзосомальных микроРНК (miR-126-3p, miR-144-3p, miR-885-5p, miR-625-3p, miR-28-5p, miR-508-3p, miR-149-3p, miR-424-5p, miR-92a-1-5p, miR-210-3p, miR-146a-5p, miR-218-1-3p, miR-155-3p, miR-503, miR-410, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-34a-5p, miR-106-5p, miR-17-5p, miR-let-7d-5p, miR-20b-5p, miR-485-3p, miR-425-5p, miR-23b-3p, miR-122-5p, miR-93-5p, miR-652-3p, miR-191-5p, miR-20a-5p), вовлеченных в регуляцию сигнальных путей иммунного ответа, у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.
2. Провести анализ взаимосвязи уровней относительной экспрессии микроРНК с ответом на терапию согласно международным критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.).
3. Провести анализ частот аллелей и генотипов полиморфных локусов rs2910164 и rs57095329, локализованных в регуляторной области гена miR-146a-5p, у пациентов с разной степенью иммуноопосредованных нежелательных явлений при терапии препаратами ИКТИ.
4. Провести функциональный анализ сигнальных путей, в регуляцию которых вовлечены выявленные дифференциально экспрессированные микроРНК.
5. Провести полногеномное бисульфитное секвенирование 8 образцов ДНК, выделенных из крови пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком, демонстрирующих эффективный и не эффективный ответ на терапию препаратами ИКТИ с целью выявления дифференциально метилированных регионов генов, ассоциированных с ответом на терапию ИКТИ.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком из Республики Башкортостан, которым назначена терапия ИКТИ. Собрана уникальная коллекция 86 образцов ДНК пациентов с скПКР, получавших терапию ИКТИ, а также уникальная коллекция 50 образцов плазмы пациентов до и после терапии ИКТИ.

Впервые проведён анализ экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов до и после терапии ИКТИ. Впервые выявлены 5 микроРНК (miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-424-5p, miR-34a-5p, miR-210-3p), демонстрирующие статистически значимые различия в уровнях экспрессии до и после терапии ИКТИ у пациентов, отвечающих на терапию согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.).

Выполнен анализ ассоциации полиморфных вариантов в регуляторной области микроРНК с риском развития тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии ИКТИ.

Выявлено, что микроРНК с достоверно изменёнными уровнями экспрессии формируют единую регуляторную сеть, модулирующую эффективность иммунотерапии через критически важные сигнальные пути NF-кБ и PI3K/АКТ у пациентов с скПКР, получающих терапию ИКТИ.

Также впервые было проведено полногеномное бисульфитное секвенирование образцов ДНК пациентов, отвечающих и не отвечающих на терапию ИКТИ, в ходе которого выявлены дифференциально метилированные регионы генов микроРНК, коррелирующие с результатами анализа уровней экспрессии экзосомальных микроРНК, идентифицированы ключевые сигнальные пути.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучена взаимосвязь между уровнем экспрессии экзосомальных микроРНК и эффективностью терапии ИКТИ, идентифицированы микроРНК, демонстрирующие статистические значимые различия в уровнях экспрессии до и после терапии ИКТИ у пациентов с скПКР, демонстрирующих ответ на терапию согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.).

Результаты данного исследования существенно углубляют понимание генетических основ эффективности терапии ИКТИ при скПКР. Изучена взаимосвязь между профилированием экзосомальных микроРНК и наблюдаемой эффективностью терапии ИКТИ, идентифицированы микроРНК, демонстрирующие статистические значимые различия в уровнях экспрессии до и после терапии ИКТИ у пациентов с скПКР, демонстрирующих ответ на терапию согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.). Идентифицированы предиктивные биомаркеры, которые могут быть использованы для оценки эффективности терапии ИКТИ при скПКР в клинической практике.

Методология и методы исследования

Исследование проведено с использованием передовых методик и современного аналитического оборудования. В основе методологии лежит комплексный подход, предусматривающий интеграцию генетических, клинических и статистических данных, а также обобщение результатов ключевых отечественных и зарубежных публикаций в области онкогенетики. В работе использован широкий ассортимент современных приёмов молекулярной биологии, биохимии и вычислительных инструментов биоинформатики.

Положения, выносимые на защиту

1. Экзосомальные микроРНК miR-146a-5p, miR-34a-5p, miR-424-5p, miR-210-3p и miR-126-3p демонстрируют статистически значимые различия в уровнях экспрессии до и после терапии ИКТИ у пациентов с скПКР.

2. Повышение уровня экспрессии экзосомальных микроРНК miR-146a-5p, miR-34a-5p, miR-424-5p, miR-210-3p и понижение уровня экспрессии miR-126-3p после терапии ИКТИ достоверно коррелируют с полным ответом на терапию ИКТИ у пациентов с скПКР согласно международным критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.).

3. Аллель rs2910164*С полиморфного варианта гена miR-146a-5p ассоциирован с повышением риска развития тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии ИКТИ.

4. Дифференциально экспрессированные экзосомальные микроРНК miR-146a-5p, miR-34a-5p, miR-424-5p, miR-210-3p и miR-126-3p регулируют воспалительный ответ через модуляцию

ключевых звеньев NF-кБ и Р13К/АКТ-сигнальных путей, обеспечивая последующую иммуномодуляцию и усиливая эффективность иммунотерапии препаратами ИКТИ.

5. Полногеномное бисульфитное секвенирование генома выявило 1297 дифференциально метилированных регионов у пациентов, демонстрирующих полный ответ на терапию ИКТИ; 640 регионов были гиперметилированы, а 657 — гипометилированы по сравнению с пациентами, у которых отмечалось отсутствие ответа на терапию ИКТИ.

6. У пациентов с полным ответом на терапию ИКТИ наблюдается гипометилирование промоторных регионов генов miR-146a-5p, miR-424-5p, miR-34a-5p и miR-210-3p и коррелирует с повышением их уровня экспрессии, тогда как гиперметилирование промоторной области гена miR-126-3p, наоборот, с понижением уровня экспрессии.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов подтверждается проведением исследования на репрезентативных выборках с использованием современного высокотехнологичного оборудования, применением адекватных методов и подходов молекулярно-генетического анализа и статистической обработки данных. По результатам диссертации опубликовано 5 экспериментальных статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК. Основные результаты научной работы представлены в виде стеновых и устных докладов на Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2023); 77-й научно-практической конференции «Достижения фундаментальной, прикладной медицины и фармации» (Самарканд, 2023); Международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» (Томск, 2023); I Всероссийской конференции с международным участием «Персонализированная медицина и современные генетические технологии» (Уфа, 2023); 76-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых с международным участием (Нижний Новгород, 2023); II Евразийском конгрессе урологов (Уфа, 2023); Международном конгрессе по фундаментальной и клинической урологии и онкоурологии (Уфа, 2024); 13th Emirates International Urological Conference (Дубай, 2024).

Личный вклад автора в проведенные исследования

Формирование научной концепции диссертационного исследования, включая выбор направления работы и постановку исследовательских целей, осуществлялось автором в тесном сотрудничестве с научным руководителем к.б.н., доцентом Гилязовой Ириной Ришатовной. Автором проведено детальное изучение российских и международных научных источников по проблематике диссертации, выполнено самостоятельное написание полного текста работы и обеспечено непосредственное участие в создании материалов для научных публикаций и их подготовке к печати. Весь спектр экспериментальных исследований реализован автором лично без привлечения сторонних исполнителей. Автор проявил активную роль в процессе подготовки научных статей на основе полученных результатов исследования. В ходе выполнения диссертационной работы автор убедительно показал свою компетентность в самостоятельном планировании и проведении экспериментов, получении достоверных экспериментальных данных, их последующем анализе и грамотной научной интерпретации полученных результатов.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 7 в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 5 из которых опубликованы в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science и/или Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности

Диссертационное исследование отвечает требованиям научной специальности 1.5.7. Генетика. Области исследования: «Персонализированный подход в терапии», «Молекулярная диагностика», «Фармакогенетика», «Онкогенетика урологических новообразований».

Структура и объем работы

Структура диссертационной работы соответствует общепринятым стандартам и содержит введение, основную часть и заключение. Основная часть представлена рядом разделов, охватывающих литературный обзор с анализом значимости исследуемой проблематики, а также описание материалов и методологии исследования, представление полученных данных и их детальный анализ. Библиографический список насчитывает 263 литературных источника. Работа представлена на 163 страницах печатного текста и включает 14 таблиц и 13 иллюстраций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материал исследования. В исследование включены образцы венозной крови 86 пациентов с скПКР, получавших терапию ИКТИ. Критерием включения пациентов в исследование был гистологически верифицированный диагноз «светлоклеточный почечно-клеточный рак» и назначение иммунотерапии ИКТИ. Критериями исключения пациентов были радио- и химиотерапия до взятия проб, почечные карциномы других гистологических типов, наличие других злокачественных новообразований в семейном анамнезе, инфекции мочевыводящих путей и мочекаменная болезнь. Пациенты были стратифицированы согласно критериям международного консорциума базы данных по метастатическому почечно-клеточному раку (International mRCC Database Consortium, IMDC) (таблица 1).

Таблица 1 –Характеристика выборки пациентов для исследования

Характеристика	N
Возраст	60 (38–81)
Пол	
-Мужчины	66 (76,74 %)
-Женщины	20 (23,26 %)
IMDC-стратификация риска	
- Благоприятный	10 (12%)
-Промежуточный	60 (70%)
- Неблагоприятный	16 (18%)

Высокопроизводительное профилирование экспрессии микроРНК было проведено на 50 парных образцах плазмы, полученных до и после 2 курсов терапии ИКТИ. Забор образцов венозной крови у пациентов до- и после терапии проводился специалистами Республиканского клинического онкологического диспансера, отделения онкологии и урологии клиники Башкирского государственного медицинского университета (г. Уфа).

Полногеномное бисульфитное секвенирование было проведено для группы из 8 пациентов. Группа представляла собой две равные подгруппы пациентов, демонстрирующих и не демонстрирующих ответ на терапию ИКТИ (4:4). Все пациенты предоставили письменное информированное согласие на использование биологического материала для последующего проведения молекулярно-генетического анализа. Оценка ответа на терапию ИКТИ, а также оценка иммунологических побочных эффектов на фоне терапии проводилась врачами-химиотерапевтами согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST

1.1.) и общим терминологическим критериям побочных эффектов Национального института рака (Common Terminology Criteria for Adverse Events, CTCAE).

Методы исследования. Экстракцию геномной ДНК из образцов периферической венозной крови пациентов осуществляли с применением фенольно-хлороформного метода. Проверка качества полученной ДНК осуществлялась с использованием набора Qubit 1x dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение микроРНК из экзосом 1мл плазмы крови, синтез комплементарной ДНК и проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени выполняли с использованием коммерческих наборов miRCURY LNA (Qiagen, Германия). Концентрацию выделенной микроРНК определяли с помощью флуориметра Quibit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с применением коммерческого набора Qubit microRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Синтез комплементарной ДНК проводился на термоциклире Biorad T100 (Biorad, США). Определение уровня экспрессии экзосомальной микроРНК методом ПЦР в режиме реального времени выполнялось на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). Количественная оценка уровней относительной экспрессии экзосомальной микроРНК проводилась с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ (Livak et al., 2001), значения относительного уровня экспрессии представлены в виде $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Для нормализации экспрессии микроРНК использовали эндогенные контролы miR-16 и miR-1228, а также UniSp2, UniSp4, UniSp5, UniSp6 и синтетическую miR-39 в качестве контроля выделения, обратной транскрипции и амплификации из наборов miRCURY LNA (Qiagen, Германия).

Для сравнения распределений признаков между группами использовали парный критерий знаковых рангов Вилкоксона. Различия в уровне экспрессии генов и микроРНК считали статистически значимыми при $p < 0,05$ с поправкой Бенджамина–Хохберга для контроля ложного обнаружения (FDR). Для анализа путей микроРНК применяли mirPath 3.0 (DIANA Tools); результаты считали значимыми при $p < 0,01$. Выживаемость пациентов с скПКР оценивали методом Каплана–Мейера, различия кривых сравнивали лог-ранговым тестом. Диагностическую способность микроРНК определяли по ROC-кривым и площади под кривой (AUC). Все вычисления проводили в GraphPad Prism Software v.6.07 (США) и в среде R (пакет pROC).

Генотипирование полиморфных локусов выполнено методом аллель-специфичной ПЦР на приборе CFX96 Bio Rad (Bio Rad, США). Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ MS Office Excel 2010. Тест хи-квадрат (χ^2) был использован для оценки равновесия Харди-Вайнберга (HWE) в частотах аллелей и генотипов. Различия между группами сравнения также оценивались с помощью критерия хи-квадрат (χ^2).

Полногеномное бисульфитное секвенирование для оценки уровня метилирования было проведено с использованием системы высокопроизводительного секвенирования NextSeq 2000 Sequencing System на платформе Illumina (США). Подготовка библиотек ДНК проводилась с использованием TruSeq Methyl Capture EPIC Library Prep Kit (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. Качество полученных библиотек оценивалось с помощью капиллярного электрофореза на биоанализаторе Tape Station Instrument 4150 (Agilent, США) с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Биоинформационическая обработка данных выполнялась в среде conda 4.6.13 и R 4.3.3. Качество сырых данных секвенирования оценивали с помощью FastQC (0.12.1), обрезку адаптеров и низкокачественных оснований проводили с использованием CutAdapt (4.4). Для картирования бисульфитных чтений и определения метилирования применялся Bismark (0.24.2) с последующей обработкой файлов при помощи Samtools (1.16.1). Информация о метилировании извлекалась с помощью Bismark Methylation Extractor, а статистический анализ дифференциального метилирования выполнялся в methylKit (1.28.0). Аннотацию DMR проводили с использованием HOMER (4.11), а функциональный анализ

обогащения по базам данных Gene Ontology (GO) и Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) с использованием инструмента ShinyGO (0.77).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках исследования эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком был проведён комплексный анализ экспрессии микроРНК методом ПЦР в реальном времени (рисунок 1) с последующей валидацией полученных данных через изучение уровня метилирования соответствующих генов микроРНК.

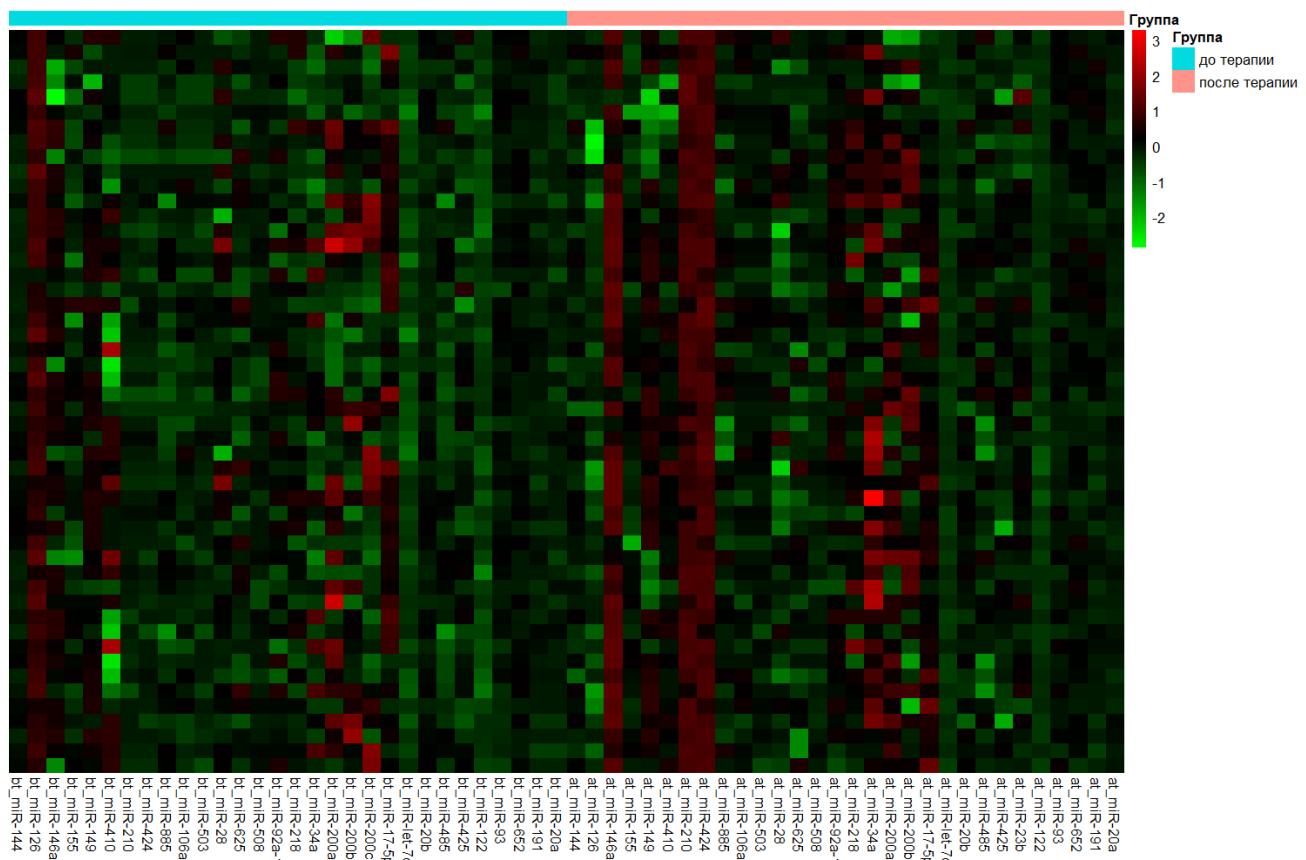


Рисунок 1 – Тепловая карта на основе анализа профиля экспрессии экзосомальных микроРНК в плазме крови пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. Зеленый цвет – понижение экспрессии, красный – повышение

Анализ экспрессии выявил статистически значимое снижение уровня экспрессии miR-126 и увеличение экспрессии miR-146a, miR-34a, miR-424 и miR-210 у пациентов после терапии по сравнению уровнями экспрессии до терапии (рисунок 2, таблица 2). Остальные микроРНК не продемонстрировали существенных различий в уровнях экспрессии микроРНК между двумя группами ($p\text{-value} > 0.05$)

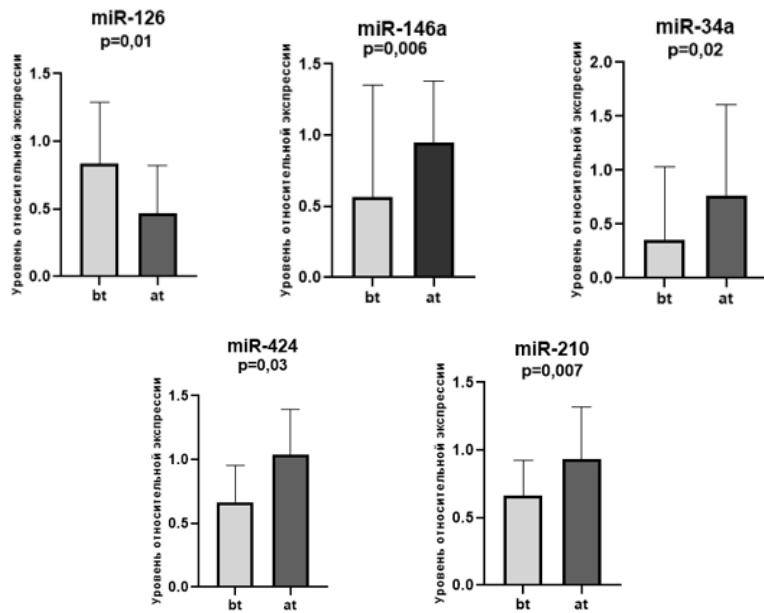


Рисунок 2 – Уровни относительной экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов, получающих терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета. Уровни относительной экспрессии представлены в виде $\log_2 \text{FoldChange}(2^{(-\Delta\Delta Ct)})$. Уровень значимости p-value рассчитывался с использованием критерия Вилкоксона. bt- до терапии, at- после терапии

Таблица 2 – Результаты анализа экспрессии генов микроРНК до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета

miRNA	До терапии (Me (IQR))	После терапии (Me (IQR))	p-value
miR-126-3p	2,15 (0,76–3,16)	4,20(1,73–5,55)	0,01
miR-146a-5p	0,85(0,55–1,03)	0,48(0,15–0,68)	0,006
miR-34a-5p	0,71(0,48–0,80)	1,02 (0,80–1,24)	0,02
miR-424-5p	0,14(0,01–0,74)	0,55(0,15–1,56)	0,03
miR-210-3p	0,71(0,51–0,81)	1,0(0,74–1,23)	0,007
miR-508-3p	0,82(0,51–1,17)	0,80(0,51–0,83)	0,0503
miR-149-3p	2,27(1,17–3,07)	2,67(0,36–4,54)	0,0835
miR-885-5p	0,61(0,32–1,31)	0,87(0,39–1,80)	0,1026
miR-92a-1-5p	1,23(0,59–2,29)	1,56(0,92–2,39)	0,3265
miR-625-3p	0,66(0,32–1,25)	0,73(0,34–1,23)	0,2358
miR-144-3p	0,92 (0,66–1,38)	1,03 (0,47–1,41)	0,6649
miR-218-1-3p	1,01(0,44–2,06)	1,22(0,78–1,96)	0,0597
miR-155-3p	0,72(0,30–1,38)	0,83(0,52–1,32)	0,2141
miR-503-3p	0,79(0,40–1,31)	1,00(0,74–1,24)	0,0322
miR-410-3p	0,53 (0,39–1,14)	0,23(0,01–0,55)	0,6719
miR-200a-3p	0,65(0,28–1,26)	0,44(0,30–0,93)	0,8016
miR-200b-3p	0,23(0,03–0,78)	0,45(0,09–1,01)	0,8689

miR-200c-3p	0,38(0,12–0,92)	0,36 (0,13–1,34)	0,0853
miR-28-5p	1,30(0,65–1,84)	0,53(0,27–1,56)	0,0927
miR-106-5p	0,79(0,40–1,51)	1,08(0,73–1,29)	0,0948
miR-17-5p	0,42(0,01–0,71)	0,35(0,11–0,68)	0,6731
miR-let-7d-5p	0,39(0,24–0,47)	0,45(0,35–0,56)	0,0858
miR-20b-5p	1,03(0,66–1,38)	1,06(0,47–1,45)	0,6667
miR-485-3p	0,51(0,29–2,89)	0,82(0,35–1,60)	0,1202
miR-425-5p	0,78(0,30–1,38)	0,72(0,47–1,32)	0,5835
miR-23b-3p	1,04(0,55–1,80)	1,11(0,54–1,95)	0,5934
miR-122-5p	0,36(0,25–0,49)	0,45(0,34–0,55)	0,0531
miR-93-5p	1,14(0,74–1,29)	0,99(0,74–1,53)	0,4533
miR-652-3p	1,14(0,79–1,63)	1,25(0,79–1,45)	0,6186
miR-191-5p	0,77(0,53–0,99)	0,80(0,52–1,17)	0,0585
miR-20a-5p	0,73(0,50–0,89)	0,79(0,63–1,03)	0,1101

Примечания: показатели экспрессии представлены в виде медианных значений с указанием межквартильного размаха (25–75%) (Median (25%–75% IQR)); Р — уровень статистической значимости, рассчитанный с использованием критерия Вилкоксона.

МикроРНК с достоверно изменёнными уровнями экспрессии до и после терапии ИКТИ, были распределены на два кластера в зависимости от их функциональной значимости при иммунотерапии ИКТИ. В первую группу вошли микроРНК, демонстрирующие статистически значимые изменения экспрессии после терапии ИКТИ и непосредственно модулирующие ответ на лечение (miR-424, miR-210, miR-126, miR-34a), тогда как вторую группу составляет miR-146a, ассоциированная с появлением иммunoопосредованных нежелательных явлений, уровень экспрессии которой коррелировали с тяжестью и характеристиками побочных эффектов.

Сопоставление полученных молекулярных данных с историями болезни пациентов показало наличие корреляции между изменением экспрессии этих микроРНК и клиническим ответом на терапию (таблица 3). Все статистически значимые различия в уровнях экспрессии были зафиксированы у пациентов, продемонстрировавших полный ответ согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.).

Таблица 3 – Дифференциально экспрессированные микроРНК, которые коррелируют с ответом на терапию ИКТИ

микроРНК	Критерий ранговой корреляции Спирмена r_s	p-value
miR-126	0,4811	0,0030
miR-146a	-0,5604	0,0004
miR-210	-0,4665	0,0041
miR-34a	-0,4506	0,0058
miR-424	-0,5286	0,0009

Далее была проведена оценка прогностической значимости экзосомальных микроРНК у пациентов, получавших терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа. Особое внимание уделялось их роли как потенциальных маркеров общей выживаемости, риска развития

иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии и эффективности проводимого лечения. Оценка общей выживаемости пациентов на основе анализа экспрессии miR-146а не выявила статистически значимой разницы между группами с низким и высоким уровнем экспрессии (рисунок 3).

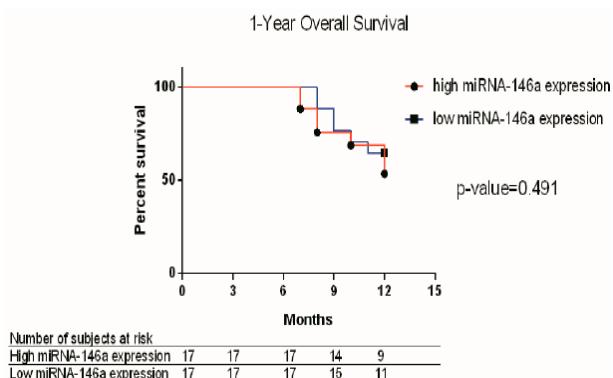


Рисунок 3 – Анализ выживаемости методом Каплана–Мейера по результатам экспрессии miR-146а

Тем не менее, дальнейший анализ показал, что комбинация miR-146а и miR-126 может быть информативной в прогнозировании степени выраженности иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии. Применение логистической регрессии с последующим построением ROC-кривой позволило установить, что данная комбинация демонстрирует значение площади под кривой (AUC) 0,752 (95% ДИ: 0,585–0,918) при чувствительности 64,3% и специфичности 78,9% (рисунок 4).

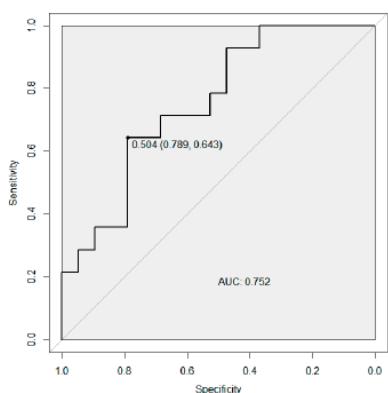


Рисунок 4 – Анализ ROC кривых комбинации miR-146а и miR-126 для прогнозирования развития тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета

Для оценки диагностической точности экзосомальных микроРНК как маркеров эффективности терапии ИКТИ были построены ROC-кривые. Результаты показали, что площадь под кривой (AUC) miR-424 составляет 0.804 (95% ДИ: 0.7082–0.9006) и обеспечивает 73.8% специфичности и 88.1% чувствительности; диагностическая точность miR-424 выше, чем у комбинации miR-146а и miR-424 (рисунок 5).

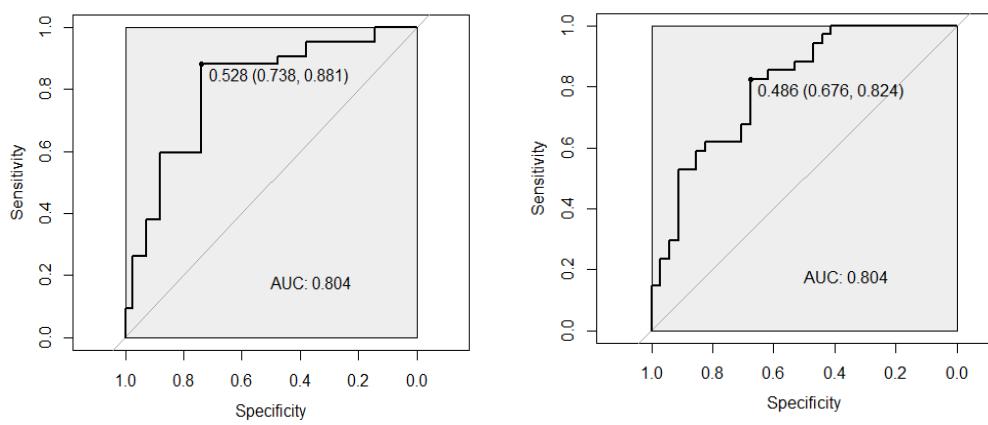


Рисунок 5—ROC-анализ для прогнозирования ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета на основе анализа экспрессии экзосомальной miR-424 и комбинации miR-146а и miR-424

С использованием DIANA tools (DIANA TOOLS - mirPath v.3 [сайт]. URL: <https://diana.e-ce.uth.gr/tools> (дата обращения 01.10.2025) проведен анализ биологических путей потенциальных генов-мишеней исследуемых микроРНК, по базе данных KEGG выявлено более десяти значительно обогащенных сигнальных путей (таблица 4).

Таблица 4—Анализ путей обогащения KEGG

Путь	Количество генов	Количество таргетных генов	p-value	FDR
Сигнальные пути, ассоциированные с раком	555	301	$2,94 \times 10^{-13}$	$2,00 \times 10^{-11}$
Автофагия у животных	146	106	$2,95 \times 10^{-16}$	$5,03 \times 10^{-14}$
PI3K-Akt сигнальный путь	372	197	$5,38 \times 10^{-8}$	$6,55 \times 10^{-7}$
Транскрипционная дисрегуляция в раке	206	113	0,00000452	0,0000280
Ras сигнальный путь	241	124	0,00000892	0,000380
Фокальная адгезия	213	135	$8,89 \times 10^{-13}$	$4,33 \times 10^{-11}$
Клеточный цикл	129	89	$8,25 \times 10^{-12}$	$2,81 \times 10^{-10}$
MAPK- сигнальный путь	329	172	0,00000114	0,00000924
HIF-1 сигнальный путь	112	67	0,00000954	0,0000561
Экспрессия PD-L1 и путь контрольной точки PD-1 при раке	101	53	0,00525	0,0157
Почечно-клеточная карцинома	70	56	$4,17 \times 10^{-12}$	$1,58 \times 10^{-10}$
Hippo-сигнальный путь	164	98	$9,58 \times 10^{-8}$	0,00000109

Дополнительно были проанализированы статистически значимые микроРНК и их роль в регуляции сигнальных путей, задействованных в ответе на иммунотерапию ингибиторами контрольных точек иммунитета при светлоклеточном почечно-клеточном раке. Проведенный интегральный анализ выявил, что все исследуемые микроРНК конвергируют в регуляции

воспалительного ответа через различные точки воздействия на PI3K/AKT-сигналинг и последующую иммуномодуляцию, что может объяснять их совокупное влияние на эффективность иммунотерапии (рисунок 6, рисунок 7, таблица 5). Данные микроРНК формируют регуляторную сеть, где miR-146а контролирует интенсивность воспалительного ответа, miR-34а и miR-424 регулируют экспрессию иммунных контрольных точек, miR-126 модулирует состав опухолевого микроокружения и ангиогенез, а miR-210 адаптирует метаболические аспекты противоопухолевого иммунитета в условиях тканевой гипоксии.

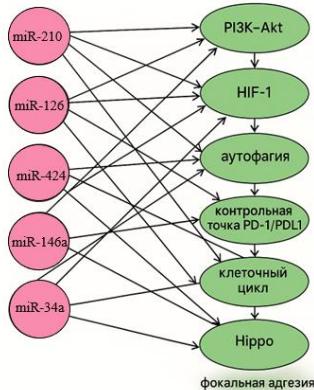


Рисунок 6 – Сетевая диаграмма взаимосвязей микроРНК и сигнальных путей в светлоклеточном почечно-клеточном раке в контексте иммунотерапии

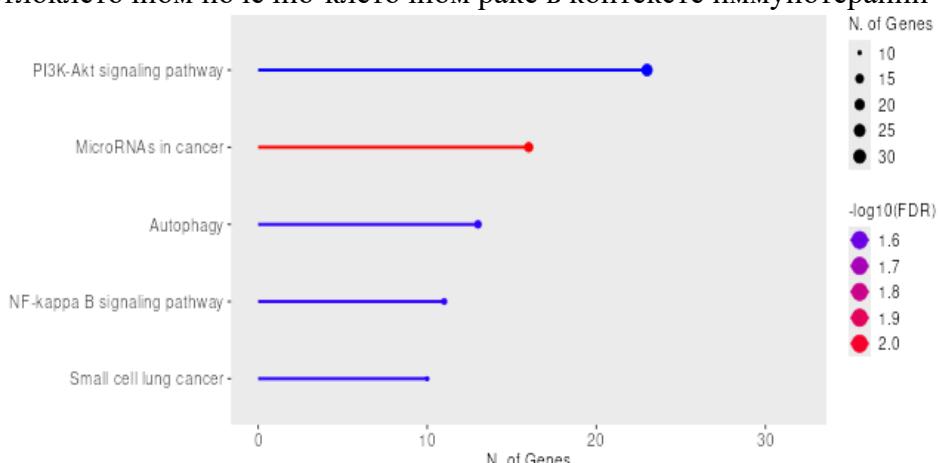


Рисунок 7 – Анализ обогащения общих сигнальных путей для значимых микроРНК при иммунотерапии светлоклеточного почечно-клеточного рака по данным базы KEGG

Таблица 5 – Обогащенные биологические пути по данным базы KEGG для значимых микроРНК при иммунотерапии светлоклеточного почечно-клеточного рака

Название сигнального пути	Количество генов-мишеней	Количество генов сигнального пути	Кратность обогащения	FDR обогащения
Сигнальный путь PI3K-Akt	23	354	2,1	$2,8 \times 10^{-2}$
Сигнальный путь NF-kappa B	11	104	3,5	$2,8 \times 10^{-2}$
Сигнальный путь автофагии	13	141	3	$2,8 \times 10^{-2}$

МикроРНК при раке	16	161	3,3	$8,9 \times 10^{-3}$
Мелкоклеточный рак лёгкого	10	92	3,6	$2,8 \times 10^{-2}$

Анализ ассоциации rs2910164 гена miR-146а показал, что носители генотипа СС и аллеля С имели более высокий риск развития тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии ИКТИ (3-4 степени по шкале СТСАЕ) (таблица 6).

Таблица 6 – Анализ ассоциации rs2910164 с риском развития токсичности различной степени по шкале СТСАЕ

Генотип/ Аллель	Степень токсичности 0–2 степени (n=51) n (%)	Степень токсичности 3–4 степени (n=35) n (%)	χ^2	OR	95% CI	p-value
GG	34 (67)	17 (49)	2.11	0.47	0.19-1.14	0.47
GC	15 (28.8)	11 (30)	0.00	1.00	-	1.00
CC	2 (4.2)	7 (21)	4.13	6.12	1.19-31.53	0.028
G	83 (81.4)	45 (64.3)	5.5	0.41	0.21-0.82	0.013
C	19 (18.6)	25 (35.7)		2.42	1.2-4.8	

В дополнение анализ экспрессии выявил статистически значимое ($p = 0,02$) снижение уровня экспрессии miR-146а у пациентов с иммуноопосредованными нежелательными явлениями 3–4 степени (Ме (IQR) 0,46 (0,06- 0,91)) по сравнению с группой пациентов с иммуноопосредованными нежелательными явлениями 0–2 степени (Ме (IQR) 1,24 (0,73- 1,32) (рисунок 8).

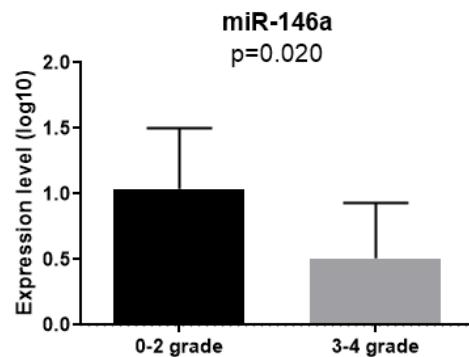


Рисунок 8 – Уровень экспрессии miR-146а у пациентов с иммуноопосредованными нежелательными явлениями различной степени тяжести

При исследовании полиморфного варианта rs57095329 гена miR-146а показано, что у пациентов с иммуноопосредованными нежелательными явлениями на фоне терапии 0-2 степеней токсичности по шкале СТСАЕ частота генотипа AA составила 91,3%, у пациентов с 3-4 степенью токсичности – 93%. Схожие частоты в обеих исследуемых группах были выявлены и для генотипа AG, который обнаруживался с частотами 8,9% и 7,0%, соответственно. Генотип GG не выявлен ни у одного из обследуемых. Анализ ассоциации данного полиморфного варианта с риском развития иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии в двух группах пациентов, получавших терапию ИКТИ, не выявил статистически значимых различий ($p\text{-value} > 0,05$). Анализ

распределения частот аллелей между пациентами с иммуноопосредованными нежелательными явлениями 0-2 и 3-4 степени токсичности по шкале CTCAE также не выявил статистически значимых результатов ($p\text{-value} > 0,05$).

В результате анализа данных полногеномного бисульфитного секвенирования между ответчиками и неответчиками было выявлено 1297 дифференциально метилированных регионов ($p\text{-adj} = 0,01$ и разницы в метилировании в 25%). Из них 640 регионов гиперметилированы, а 657 гипометилированы (рисунок 9).

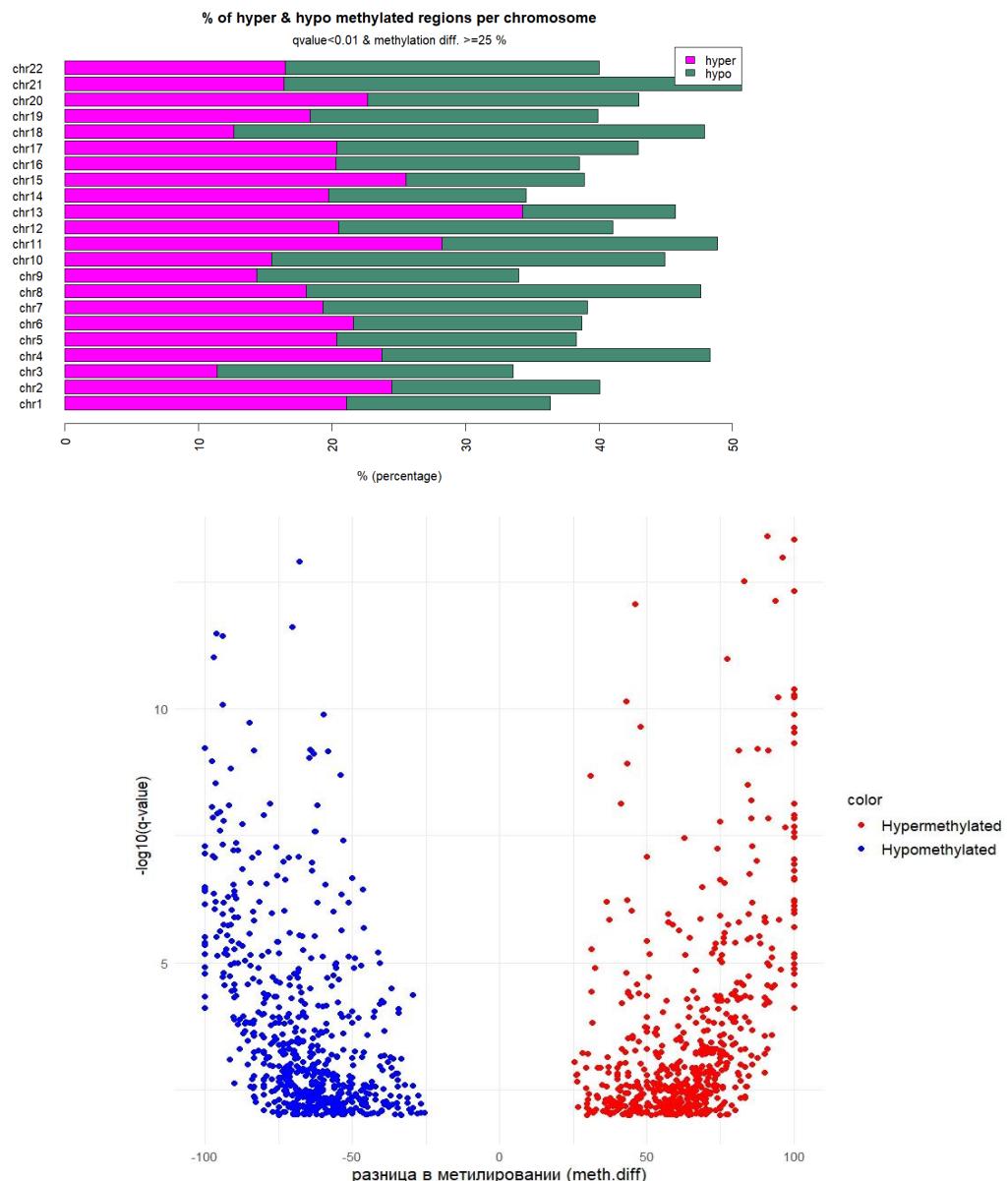


Рисунок 9—Дифференциально метилированные регионы у пациентов, демонстрирующих ответ на терапию ИКТИ относительно пациентов, у которых отсутствует ответ на терапию ИКТИ

Для проведения корреляционного анализа взаимосвязи между статусом метилирования и уровнем экспрессии из общего числа исследуемых генов была отобрана специфическая группа генов миРНК. Отбор осуществлялся на основе предварительных результатов анализа экспрессии методом ПЦР в реальном времени, где приоритет отдавался миРНК, демонстрирующим статистически значимые различия до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. (рисунок 10, таблица 7).

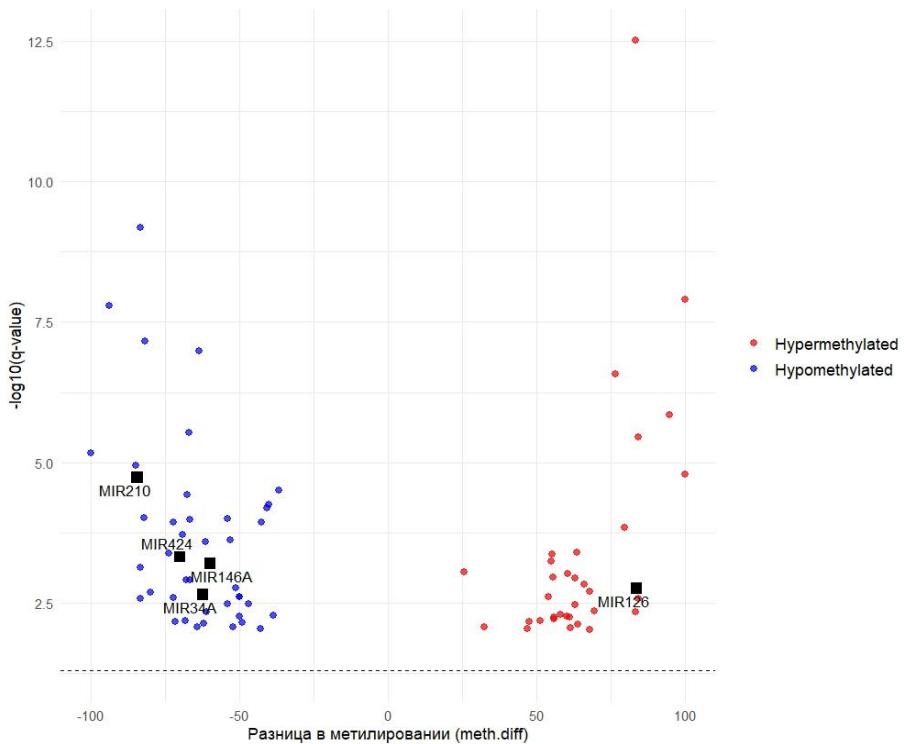


Рисунок 10– Уровень метилирования микроРНК пациентов, демонстрирующих ответ на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета относительно пациентов, не отвечающих на терапию

Таблица 7– Результаты анализа статуса метилирования генов микроРНК пациентов, демонстрирующих ответ на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета относительно пациентов, не отвечающих на терапию

FDR	Разница метилирования (meth.diff)	Статус метилирования	Ген
0,001703	83,33333333	Гиперметилирован	miR-126
0,000618	-60,02457002	Гипометилирован	miR-146a
0,002199	-62,5	Гипометилирован	miR-34a
0,000466	-70,16317016	Гипометилирован	miR-424
$1,79 \times 10^{-5}$	-84,61538462	Гипометилирован	miR-210
$6,77 \times 10^{-6}$	-100	Гипометилирован	miR-4462
$1,14 \times 10^{-5}$	-84,78664193	Гипометилирован	miR-3177
0,002668	-83,33333333	Гипометилирован	miR-5700
$6,72 \times 10^{-10}$	-83,33333333	Гипометилирован	miR-12131
0,000729	-83,33333333	Гипометилирован	miR-5194
$9,46 \times 10^{-5}$	-82,05128205	Гипометилирован	miR-4758
$6,88 \times 10^{-8}$	-81,81818182	Гипометилирован	miR-12131
0,002053	-80	Гипометилирован	miR-4656
0,000412	-73,68421053	Гипометилирован	miR-1202
0,000117	-72,22222222	Гипометилирован	miR-6880
0,002484	-72,22222222	Гипометилирован	miR-4283-1

0,006795	-71,57894737	Гипометилирован	miR-4274
0,000189	-69,04761905	Гипометилирован	miR-153-2
0,006494	-68,18181818	Гипометилирован	miR-378C
0,001217	-67,85714286	Гипометилирован	miR-12115
$3,77 \times 10^{-5}$	-67,48271889	Гипометилирован	miR-8078
$2,93 \times 10^{-6}$	-67,04545455	Гипометилирован	miR-595
0,001212	-66,7989418	Гипометилирован	miR-8078
0,008343	-64,1509434	Гипометилирован	miR-8073
$1,05 \times 10^{-7}$	-63,63636364	Гипометилирован	miR-4251
0,00726	-62,05357143	Гипометилирован	miR-4689
0,000258	-61,53846154	Гипометилирован	miR-637
0,004565	-61,11111111	Гипометилирован	miR-1301
0,000101	-54,07989075	Гипометилирован	miR-153-2
0,0033	-53,94548063	Гипометилирован	miR-3199-1
0,000242	-53,06122449	Гипометилирован	miR-4530
0,008522	-52,10727969	Гипометилирован	miR-7850
0,001684	-51,14285714	Гипометилирован	miR-6787
0,002422	-50	Гипометилирован	miR-765
0,002422	-50	Гипометилирован	miR-5587
0,005495	-50	Гипометилирован	miR-1302-7
0,007024	-48,96810507	Гипометилирован	miR-4644
0,00332	-47,05882353	Гипометилирован	miR-3689C
0,008967	-42,85714286	Гипометилирован	miR-602
0,000117	-42,68852459	Гипометилирован	miR-3667
$6,5 \times 10^{-5}$	-40,66666667	Гипометилирован	miR-8078
$5,51 \times 10^{-5}$	-40,19379845	Гипометилирован	miR-4655
0,005229	-38,68563686	Гипометилирован	miR-10396A
$3,12 \times 10^{-5}$	-36,87002653	Гипометилирован	miR-8078
0,000897	25,47604967	Гиперметилирован	miR-6774
0,008478	32,22222222	Гиперметилирован	miR-6769A
0,009016	46,875	Гиперметилирован	miR-4758
0,006842	47,47690121	Гиперметилирован	miR-6716
0,006585	51,13122172	Гиперметилирован	miR-9-3HG
0,002422	53,84615385	Гиперметилирован	miR-3182
0,000571	54,83375959	Гиперметилирован	miR-153-2
0,000419	55	Гиперметилирован	miR-3529
0,001104	55,56338028	Гиперметилирован	miR-153-2
0,006078	55,81395349	Гиперметилирован	miR-7155
0,005644	55,88235294	Гиперметилирован	miR-5087
0,004976	58,01713586	Гиперметилирован	miR-4744
0,005367	60	Гиперметилирован	miR-6124
0,000956	60,41666667	Гиперметилирован	miR-4472-2
0,005684	61,11111111	Гиперметилирован	miR-4634
0,008592	61,2244898	Гиперметилирован	miR-4283-2
0,00113	62,73712737	Гиперметилирован	miR-548
0,003405	62,96296296	Гиперметилирован	miR-4472-1

0,000392	63,37209302	Гиперметилирован	miR-4274
0,007589	63,75	Гиперметилирован	miR-554
0,001445	65,85365854	Гиперметилирован	miR-12118
0,009287	67,80487805	Гиперметилирован	miR-4748
0,001958	67,85714286	Гиперметилирован	miR-595
0,004412	69,44444444	Гиперметилирован	miR-6779
$2,63 \times 10^{-7}$	76,47058824	Гиперметилирован	miR-4313
$3,11 \times 10^{-13}$	83,14606742	Гиперметилирован	miR-593
0,004542	83,21678322	Гиперметилирован	miR-5190
0,002668	83,97435897	Гиперметилирован	miR-4721
$3,45 \times 10^{-6}$	84,21052632	Гиперметилирован	miR-5683
$1,4 \times 10^{-6}$	94,73684211	Гиперметилирован	miR-3201
$1,65 \times 10^{-5}$	100	Гиперметилирован	miR-4261
$1,24 \times 10^{-8}$	100	Гиперметилирован	miR-1294

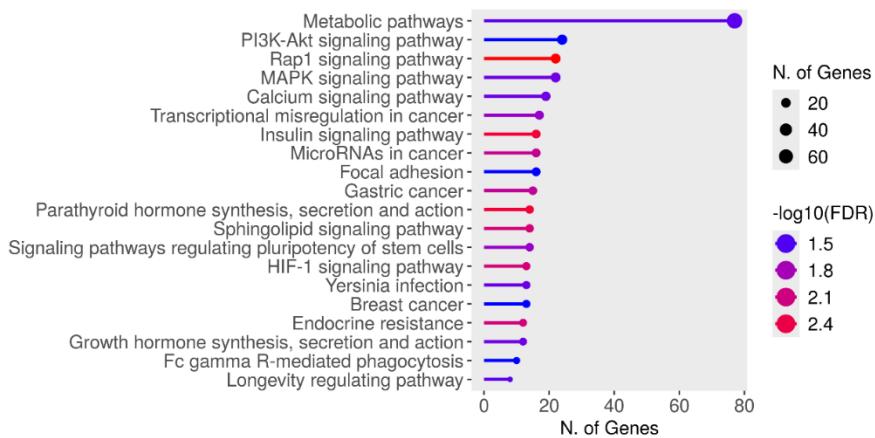
Результаты анализа показывают, что статус метилирования промоторных регионов миРНК тесно коррелирует с их экспрессией при светлоклеточном почечно-клеточном раке.

Далее нами проведен анализ обогащения сигнальных путей для гиперметилированных и гипометилированных генов соответственно (таблица 8).

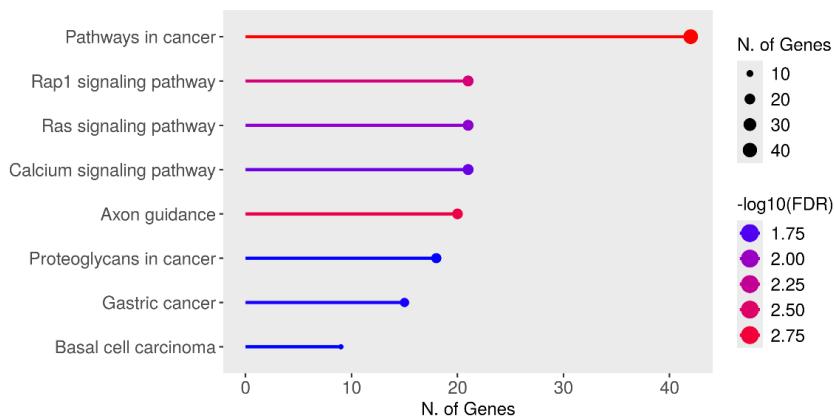
Таблица 8 – Дифференциально экспрессированные миРНК, которые коррелируют со статусом метилирования миРНК

миРНК	Критерий ранговой корреляции Спирмена r_s	p-value
miR-126	0,7381	0,04
miR-146a	0,8801	0,007
miR-210	0,7619	0,03
miR-34a	0,7857	0,02
miR-424	0,8571	0,01

Гиперметилированные гены задействованы в метаболических путях, что свидетельствует о системных изменениях метаболизма иммунных клеток, связанных с реагированием на терапию или другими адаптационными эффектами, тогда как гипометилированные гены преимущественно активированы в путях, связанных с противоопухолевым иммунным ответом. Полученные данные подтверждают роль эпигенетических изменений играют в формировании ответа на иммунотерапию при скПКР (рисунок 11, таблица 9, таблица 10).



а)



б)

Рисунок 11– Анализ обогащения по данным базы KEGG сигнальных путей гиперметилированных (а) и гипометилированных (б) генов

Таблица 9– Обогащенные биологические пути по данным базы KEGG, ассоциированные с гипометилированными генами у ответчиков на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета

Название сигнального пути	Количество генов-мишеней	Количество генов сигнального пути	Кратность обогащения	FDR обогащения
Пути при раке	42	530	2.1	1.1×10^{-3}
Направление аксона	20	181	3	2.1×10^{-3}
Сигнальный путь Rap1	21	210	2.7	3.9×10^{-3}
Сигнальный путь Ras	21	231	2.4	1.2×10^{-2}
Кальциевый сигнальный путь	21	240	2.4	1.6×10^{-2}
Рак желудка	15	148	2.7	2.1×10^{-2}
Протеогликаны при раке	18	202	2.4	2.1×10^{-2}

Базальноклеточная карцинома	9	63	3.8	2.1×10^{-2}
-----------------------------	---	----	-----	----------------------

Таблица 10— Обогащенные биологические пути по данным базы KEGG, ассоциированные с гиперметилированными генами у ответчиков на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета

Название сигнального пути	Количество генов-мишеней	Количество генов сигнального пути	Кратность обогащения	FDR обогащения
Метаболические пути	77	1527	1.4	3.0×10^{-2}
Пути при раке	32	530	1.7	4.1×10^{-2}
Сигнальный путь PI3K-Akt	24	354	1.9	3.7×10^{-2}
Сигнальный путь Rap1	22	210	2.9	2.1×10^{-3}
Сигнальный путь MAPK	22	294	2.1	2.7×10^{-2}
Кальциевый сигнальный путь	19	240	2.2	2.7×10^{-2}
Нарушение транскрипционной регуляции при раке	17	192	2.5	1.9×10^{-2}
Инфекция цитомегаловирусом человека	17	224	2.1	4.1×10^{-2}
Сигнальный путь инсулина	16	137	3.3	3.3×10^{-3}
МикроРНК при раке	16	161	2.8	9.7×10^{-3}
Фокальная адгезия	16	200	2.2	3.7×10^{-2}
Рак желудка	15	148	2.8	1.1×10^{-2}
Синтез, секреция и действие паратиреоидного гормона	14	106	3.7	3.3×10^{-3}
Сигнальный путь сфинголипидов	14	119	3.3	7.0×10^{-3}
Пути сигнальной передачи, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток	14	143	2.7	1.9×10^{-2}
Сигнальный путь HIF-1	13	109	3.3	7.3×10^{-3}
Инфекция иерсинией	13	137	2.6	2.8×10^{-2}
Рак молочной железы	13	147	2.5	3.7×10^{-2}
Сигнальный путь Hippo	13	157	2.3	4.5×10^{-2}
Эндокринная устойчивость	12	95	3.5	7.3×10^{-3}

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия ингибиторами контрольных точек иммунитета при светлоклеточном почечно-клеточном раке даёт значимые клинические результаты, однако положительный ответ наблюдается лишь у части пациентов. Из-за гетерогенности опухолевой микросреды и вариабельности иммунного надзора эффективность терапии остаётся непредсказуемой. Поэтому важно выявлять биомаркеры, позволяющие заранее определить чувствительных к лечению

пациентов. Перспективными кандидатами считаются экзосомальные микроРНК, отличающиеся стабильностью, специфичностью и отражающие молекулярный статус опухоли.

В работе проанализированы 86 образцов ДНК и 50 парных образцов плазмы пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком, получавших терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета. С помощью ПЦР и полногеномного бисульфитного секвенирования выявлены специфические паттерны экспрессии и метилирования 31 микроРНК, отражающие иммунный ответ и прогнозирующие эффективность терапии. Идентифицированы пять экзосомальных микроРНК (miR-126-3p, miR-146a-5p, miR-424-5p, miR-34a-5p, miR-210-3p) как потенциальные биомаркеры. В результате проведенного полногеномного бисульфитного секвенирования обнаружено 1297 дифференциально метилированных регионов у пациентов с полным ответом на терапию, среди них 640 демонстрируют гиперметилирование, а 657- гипометилирование по сравнению с пациентами, не демонстрирующими ответ на терапию. Обнаружена корреляция между изменениями экспрессии микроРНК и степенью ответа на иммунотерапию согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.); у пациентов с полным клиническим ответом снижено метилирование генов miR-146a, miR-424, miR-34a и miR-210, и одновременно повышенено метилирование miR-126, что связано с соответствующими уровнями их экспрессии. В результате комплексного выявления и характеристики регуляторных механизмов микроРНК-опосредованного контроля противоопухолевого иммунного ответа впервые продемонстрировано, что дифференциально экспрессируемые микроРНК образуют интегрированную регуляторную систему, координирующую сигнальные пути иммунотерапевтического ответа NF-кВ и PI3K/АКТ. В этой сети miR-146a регулирует воспаление, miR-34a и miR-424 контролируют иммунные контрольные точки, miR-126 влияет на опухолевое микроокружение и ангиогенез, а miR-210 адаптирует метаболизм иммунитета при тканевой гипоксии. Обнаружено, что генотип СС и аллель С полиморфного локуса rs2910164 гена miR-146a связаны с повышенным риском развития тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений при терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. Полиморфизм влияет на экспрессию miR-146a, и снижение её уровня способствует более выраженной воспалительной реакции, что увеличивает вероятность осложнений.

Проведённое исследование светлоклеточного почечно-клеточного рака с выявлением генетических и эпигенетических маркеров, включая анализ экзосомальных микроРНК и генетических полиморфизмов, открывает новые возможности для персонализированной иммунотерапии, оптимизируя подбор пациентов, улучшая лечение и предотвращая серьёзные осложнения, что соответствует современным тенденциям молекулярной онкологии и способствует разработке клинических тест-систем и индивидуальных протоколов терапии.

ВЫВОДЫ

1. Анализ экспрессии 31 гена экзосомальных микроРНК выявил 5 дифференциально экспрессируемых микроРНК у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета: miR-146a-5p (Fold Change= 1.730, p=0.006), miR-126-3p (Fold Change= 0.559, p=0.01), miR-424-5p (Fold Change= 1.561, p=0.03), miR-34a-5p (Fold Change= 2.150, p=0.02), miR-210-3p (Fold Change= 1.404, p=0.007).
2. Выявлена корреляция между уровнем экспрессии miR-146a-5p, miR-126-3p, miR-424-5p, miR-34a-5p, miR-210-3p и выраженностью ответа на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком. Пациенты, у которых после терапии наблюдается статистически значимое повышение экспрессии miR-146a-5p ($r_s = -0,5604$, $p = 0,0004$), miR-34a-5p ($r_s = -0,4506$, $p = 0,0058$), miR-424-5p ($r_s = -0,5286$, $p = 0,0009$) и miR-210-3p ($r_s = -0,4665$,

$p=0,0041$), а также снижение уровня miR-126-3p ($r_s=0,4811$, $p=0,003$) чаще демонстрируют полный ответ на терапию ИКТИ согласно критериям оценки ответа на терапию солидных опухолей (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST 1.1.).

3. Маркерами повышенного риска развития тяжелых иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии ИКТИ при светлоклеточном почечно-клеточном раке являются генотип rs2910164*CC и аллель rs2910164*С гена miR-146а-5р, коррелирующие со снижением ее экспрессии и ослаблением негативной регуляции генов *IRAK1* и *TRAF6*, приводящей к иммунной гиперактивации.

4. В результате функционального анализа показано, что миРНК со статистически значимыми измененными уровнями экспрессии образуют единую регуляторную сеть, которая модулирует эффективность иммунотерапии через сигнальные пути NF-кВ и PI3K/AKT. miR-210 и miR-126 опосредуют метаболическую адаптацию опухолевых клеток, направленно регулируя активность PI3K/AKT-каскада; miR-424 и miR-146а модулируют иммунный ответ через элементы NF-кВ-сигналинга; miR-34а связывает оба пути, контролируя клеточный цикл и снижая экспрессию PD-L1, что усиливает противоопухолевую активность иммунной системы.

5. По результатам полногеномного бисульфитного секвенирования выявлено 1297 дифференциально метилированных регионов, из которых 640 регионов гиперметилированы и 657 гипометилированы у пациентов с полным ответом на терапию ИКТИ по сравнению с пациентами, продемонстрировавшими прогрессирование заболевания при приеме данной группы препаратов.

6. Установлено снижение уровня метилирования генов miR-146а-5р, miR-126-3р, miR-424-5р, miR-34а-5р, miR-210-3р и повышение уровня метилирования гена miR-126-3р у пациентов с полным ответом на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета. Показано, что эпигенетические изменения коррелируют с результатами анализа экспрессии миРНК: гипометилирование промоторных регионов генов miR-146а-5р ($r_s= 0,8801$, $p= 0,007$), miR-424-5р ($r_s= 0,8571$, $p=0,01$), miR-34а-5р ($r_s=0,7857$, $p= 0,02$) и miR-210-3р ($r_s= 0,7619$, $p= 0,03$) коррелирует с повышением их экспрессии, гиперметилирование гена miR-126-3р ($r_s=0,7381$, $p=0,04$) – со снижением экспрессии у пациентов с полным ответом на терапию ингибиторами контрольных точек иммунитета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Асадуллина Д.Д.**, Гилязова И.Р., Иванова Е.А., Измайлова С.М., Гилязова Г.Р., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Экзосомальные миРНК-146а и миРНК-424 как возможные предикторы ответа на терапию ингибиторами иммунных контрольных точек при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме // Генетика. – 2024. – Т. 60, №3. – С.367-374. DOI: 10.1134/S1022795424030025 (WOS, SCOPUS, Q4, BAK, Глава 3.1).
2. Гилязова И.Р., **Асадуллина Д.Д.**, Иванова Е.А., Измайлова А.А., Кудлай Д.А., Гилязова Г.Р., Галимова Э.Ф., Ермаков И.Б., Рахимов Р.Р., Попова Е.В., Насретдинов А.Ф., Султанбаев А.В., Хуснутдинова Э.К., Павлов В.Н. Экзосомальные миРНК как возможные предикторы противоопухолевой эффективности ингибиторов контрольных точек иммунного ответа при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме// Молекулярная медицина. – 2023. – Т.21, №4. – С. 40-49. DOI:10.29296/24999490-2023-04-06 (BAK, Глава 3.1).
3. Ivanova E, **Asadullina D**, Gilyazova G, Rakhimov R, Izmailov A, Izmailov A, Pavlov V, Khusnutdinova E, Gilyazova I. Exosomal MicroRNA Levels Associated with Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in

Clear Cell Renal Cell Carcinoma // Biomedicines. – 2023. – 11 (3). – P.801. DOI: 10.3390/biomedicines11030801 (WOS, SCOPUS, Q1, Глава 3.1, Глава 3.3).

4. Гилязова И.Р., Измайлова А.А., **Асадуллина Д.Д.**, Иванова Е.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Предикторы эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме// Урология. – 2023. – №6. – С. 10-14. DOI: 10.18565/urology.2023.6.122-126, обзор (SCOPUS, Q4, ВАК, глава 1).

5. Гилязова И.Р., **Асадуллина Д.Д.**, Иванова Е.А., Рахимов Р.Р., Измайлова А.А., Бермишева М.А., Гилязова Г.Р., Шарифгалеев И.А., Урманцев М.Ф., Попова Е.В., Сафиханов Р.Я., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Герминальные мутации как возможные биомаркеры эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета у пациентов с почечно-клеточной карциномой // Научные результаты биомедицинских исследований. –2022. – Т.8, №2. – С.164-179 DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-2-0-3, обзор (SCOPUS, Q3, ВАК, глава 1).

6. **Асадуллина Д.Д.**, Гилязова И.Р., Иванова Е.А., Рахимов Р.Р., Насретдинов А.Ф., Измайлова А.А., Гилязова Г.Р., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Исследование ассоциации полиморфных вариантов микроРНК-146а (rs57095329 и rs2910164) с эффективностью терапии почечно-клеточного рака ингибиторами контрольных точек иммунитета // Медицинская генетика. – 2022. – Т. 21, № 7. – С. 11-15. DOI: 10.25557/2073-7998.2022.07.11-14 (ВАК, Глава 3.2).

7. Ivanova E, **Asadullina D**, Rakhimov R, Izmailov A, Galimov Sh., Pavlov V., Khusnutdinova E., Gilyazova I. Exosomal miRNA-146a is downregulated in clear cell renal cell carcinoma patients with severe immune-related adverse events // Non-coding RNA Research. –2022. –7(3). – P.159-163. DOI: 10.1016/j.ncrna.2022.06.004 (WOS, SCOPUS, Q2, Глава 3.1, Глава 3.2).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПКР – почечно-клеточный рак

скПКР – светлоклеточный почечно-клеточный рак

ИКТИ – ингибиторы контрольных точек иммунитета

RECIST – Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (Критерии оценки ответа при солидных опухолях)

CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events (Общие терминологические критерии для оценки нежелательных явлений)

KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Киотская энциклопедия генов и геномов)