

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)**

**Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)**

На правах рукописи

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

1.5.7. - Генетика

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

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:

Кандидат биологических наук, доцент
Гилязова Ирина Ришатовна

Рецензенты:

Корытина Гульназ Фаритовна
доктор биологических наук, доцент,
заведующий лабораторией
физиологической генетики

Кутлияров Линат Миниханович
Кандидат медицинских наук, доцент
кафедры урологии и онкологии
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России

Актуальность

Злокачественные новообразования почек составляют около 2% глобальных диагнозов рака и смертей от него. Около 95% всех случаев рака почки пред ставлены почечно-клеточным раком (ПКР, ПКК). В большинстве молекулярно-биологических и клинических исследований исследуют самую частую форму рака почки – светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР), составляющий около 75% случаев заболевания. За последние полвека заболеваемость ПКР в развитых странах увеличилась более чем вдвое. В России ПКР входит в число наиболее часто возникающих опухолей в общей структуре онкологических заболеваний. В 2019 году в РФ летальный исход при ПКР составил более 8000 человек. Светлоклеточная почечно-клеточный рак – злокачественная опухоль почки с плохим прогнозом и трудно поддающаяся лечению.

В последние годы произошла существенная эволюция в терапии рака, направленная главным образом на применение иммунотерапевтических подходов, заменяющих классические методы лечения, такие как химиотерапия, лучевая терапия и хирургия, или в сочетании с ними. Ингибиторы контрольных точек иммунитета (ИКТИ) являются хорошо зарекомендовавшими ми себя высокоэффективными препаратами для лечения различных видов рака, включая светлоклеточный почечно-клеточный рак.

Несмотря на революционный прорыв в лечении рака данной группой препаратов, существенная доля пациентов не демонстрирует ответа на лечение. На сегодняшний день оценка уровня экспрессии белка PD-L1 (лиганда рецептора запрограммированной клеточной гибели 1) на опухолевых клетках является единственным одобренным методом определения показаний к назначению ИКТИ, однако, данный маркер не позволяет точно спрогнозировать ответ на терапию. В связи с этим, актуален поиск дополнительных прогностических факторов для контроля эффективности лечения пациентов препаратами ИКТИ на основе комплексного генетического и эпигенетического анализа.

Степень разработанности темы

Некодирующие РНК в последние несколько лет стали ключевыми игроками в эпигенетической регуляции генов, среди них микроРНК широко исследуют на предмет их потенциальной роли в регуляции различных клеточных процессов в норме и патологии. МикроРНК – это некодирующие РНК длиной около 22 нуклеотидов, которые являются пост транскрипционными регуляторами экспрессии генов. Способность микроРНК ингибировать трансляцию онкогенов и опухолевых супрессоров предполагает их участие в канцерогенезе. Все больше работ показывают, что экзосомальные микроРНК являются ключевыми модуляторами опухолевой сигнализации и детерминантами опухолевого микроокружения.

Цель исследования

Поиск маркеров эффективности терапии ИКТИ при светлоклеточном почечно-клеточном раке.

Задачи:

1. Провести анализ уровня экспрессии экзосомальных микроРНК до и после терапии ИКТИ и ассоциацию с ответом на терапию согласно критериям RECIST.
2. Провести анализ ассоциации генотипов и аллелей полиморфных вариантов микроРНК с риском развития нежелательных явлений на фоне терапии ИКТИ

3. Провести функциональный анализ сигнальных путей, задействованных в регуляции функционально значимых микроРНК
4. Провести анализ уровня метилирования ДНК пациентов, отвечающих и не отвечающих на терапию.

Научная новизна.

Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком, получающих терапию ИКТИ. Впервые проведён анализ экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов до и после терапии ИКТИ.

Впервые выявлены микроРНК, демонстрирующие различные уровни экспрессии до и после терапии ИКТИ. Сопоставление полученных молекулярных данных с клиническими историями пациентов показало, что статистически значимые изменения экспрессии отдельных микроРНК коррелировали с положительным ответом на терапию, согласно критериям RECIST.

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

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты вносят значительный вклад в расширение понимания генетических механизмов эффективности терапии ИКТИ при светлоклеточном почечно-клеточном раке. Результаты данного исследования могут быть включены в специализированные курсы, читаемые на биологических факультетах, в медицинских образовательных учреждениях, а также в рамках программ повышения квалификации медицинского персонала.

Методология и методы исследования.

Работа выполнена при использовании актуальных методов исследования и современного оборудования.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявлены 5 дифференциально экспрессируемых экзосомальных микроРНК у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ИКТИ.
2. Выявлена корреляция между степенью изменения экспрессии этих микроРНК и выраженностью ответа на терапию согласно RECIST.
3. Проведена валидация данных экспрессии микроРНК и выявлена корреляция между степенью изменения экспрессии этих микроРНК и уровнем метилирования микроРНК..
4. Выявлена ассоциация генотипа CC и аллеля C полиморфного локуса rs2910164 гена микроРНК-146a с высоким риском развития нежелательных явлений (согласно критериям STCAE) при терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.
5. Выявлена ассоциация пониженной экспрессии микроРНК-146a с высоким риском развития нежелательных явлений (согласно критериям STCAE) (p-value = 0,020).

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. Результаты исследования апробированы на всероссийских и международных конференциях.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал исследования.

В исследовании использовались образцы венозной крови больных с почечно-клеточным раком, получавших терапию ИКТИ. Представленная научно-квалификационная работа одобрена Комитетом по биомедицинской этике ИБГ УФИЦ РАН.

Методы исследования

ДНК из периферической венозной крови индивидов из контрольной выборки выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции. Выделение экзосомальных микроРНК из 1 мл плазмы крови, синтез кДНК и количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием соответствующих наборов.

Измерение уровня экспрессии экзосомальной микроРНК проводился на приборе Rotor-Gene Q для ПЦР в реальном времени (Qiagen, Hilden, Германия). Оценку уровней экзосомальной микроРНК проводили с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Анализ SNP проводили методом ПЦР в режиме реального времени.

Оценка метилирования проводилась на платформе Illumina (США). Подготовка библиотек ДНК проводилась с использованием коммерческих наборов от Illumina.

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.

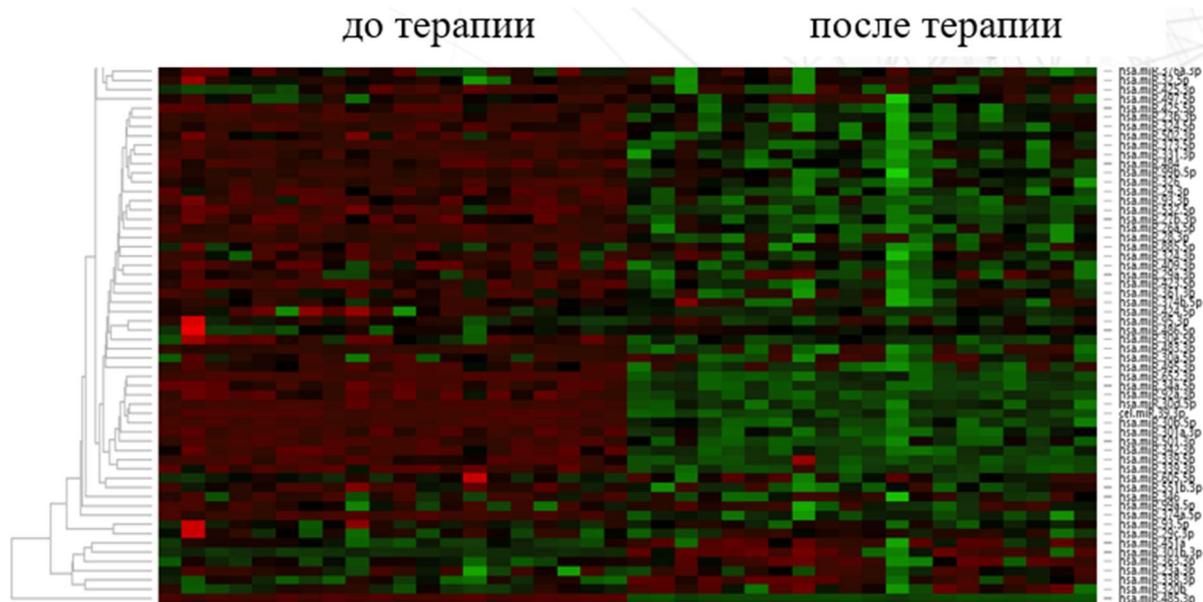


Рисунок 1. Анализ профиля экспрессии экзосомальных микроРНК в плазме крови пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.

Анализ экспрессии показал снижение уровня экспрессии микроРНК-126 и увеличение экспрессии микроРНК-146а, микроРНК-34а, микроРНК-424 и микроРНК-210 (у пациентов после терапии по сравнению уровнями экспрессии до терапии (Рисунок 2).

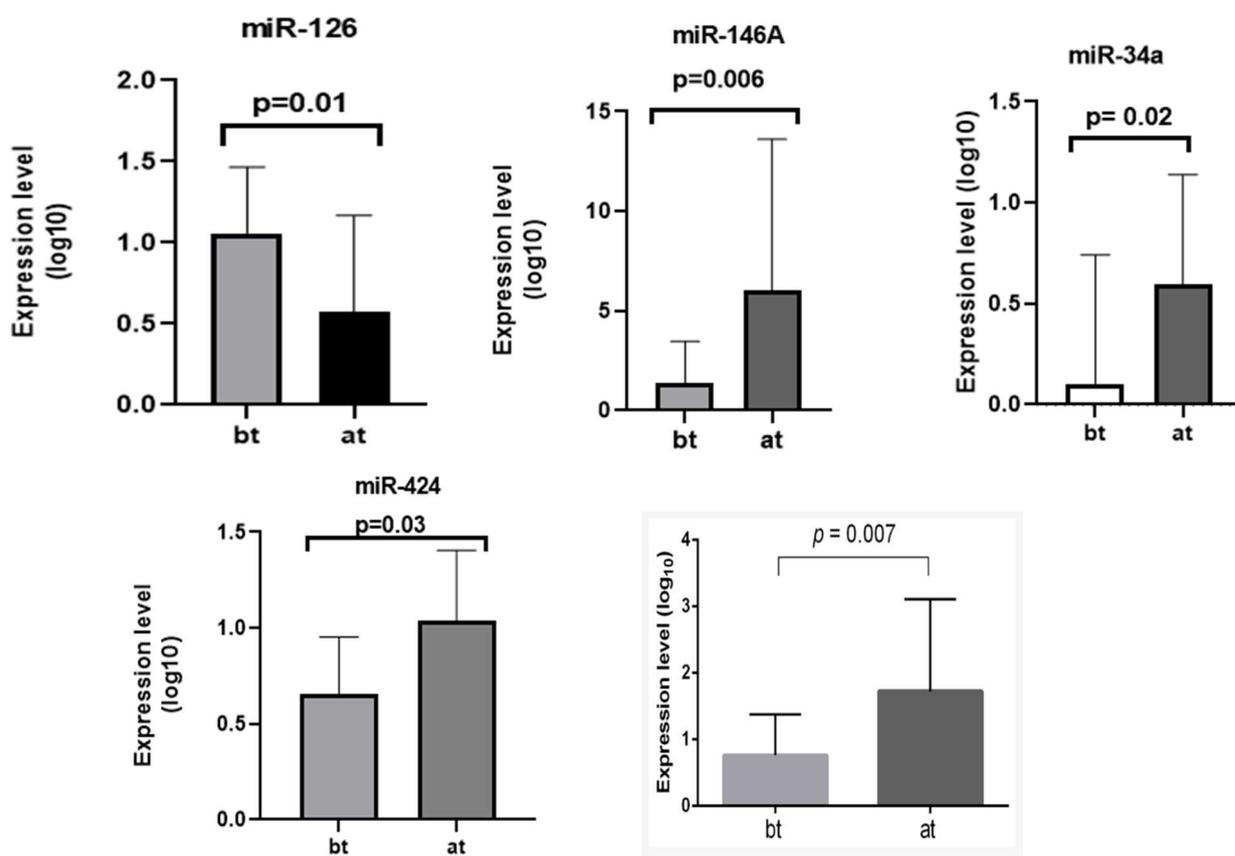


Рисунок 2. Уровни экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов, получающих терапию ИКТИ. bt- до терапии, at- после терапии.

На втором этапе проводилось изучение уровня метилирования промоторных регионов генов, кодирующих выявленные микроРНК.

В результате анализа данных полногеномного бисульфитного секвенирования между ответчиками и неответчиками были выявлены DMR. Из них 1528 регионов гиперметелированы, а 1659 гипометелированы (Рисунок 3).

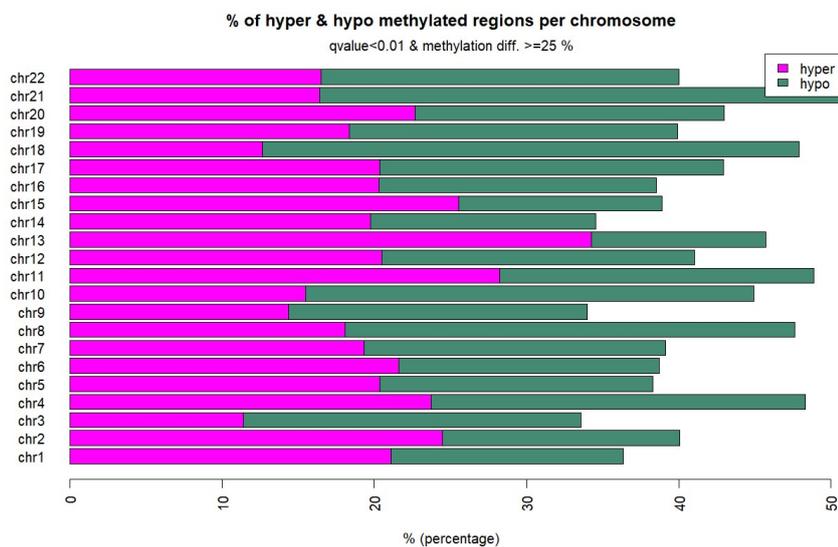


Рисунок. Процент гиперметелированных и гипометелированных регионов.

Далее была отобрана специфическая группа генов микроРНК для анализа уровня метилирования.. (Рисунок 4).

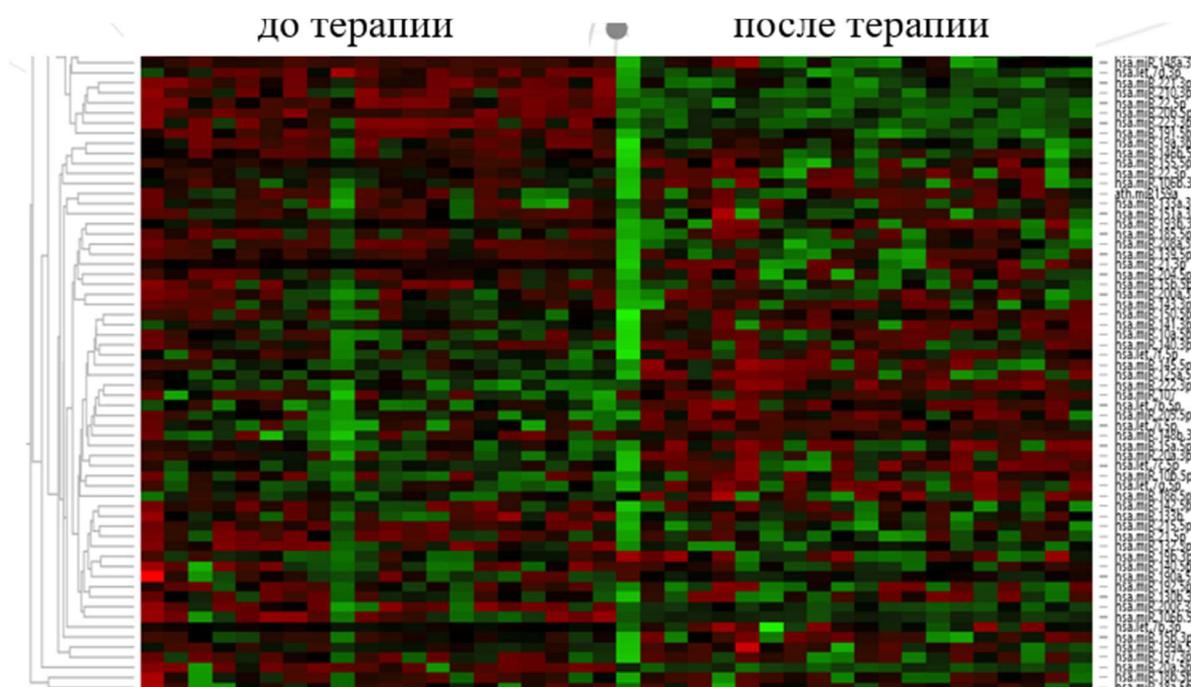


Рисунок 4 . Уровень метилирования микроРНК ответчиков на терапию ИКТИ vs не ответчиков на терапию ИКТИ

Сопоставление полученных молекулярных данных с историями болезни пациентов показало наличие корреляции между изменением экспрессии этих микроРНК и клиническим ответом на терапию. Все статистически значимые различия в уровнях экспрессии были зафиксированы у пациентов, продемонстрировавших положительный ответ на лечение, включая как частичный, так и полный ответ согласно критериям RECIST.

Проведена оценка прогностической значимости экзосомальных микроРНК у пациентов на терапии ИКТИ.

Анализ экспрессии микроРНК-146а при оценке общей выживаемости пациентов не показал статистически значимых различий между группами с низким и высоким уровнем её экспрессии. (Рисунок 5).

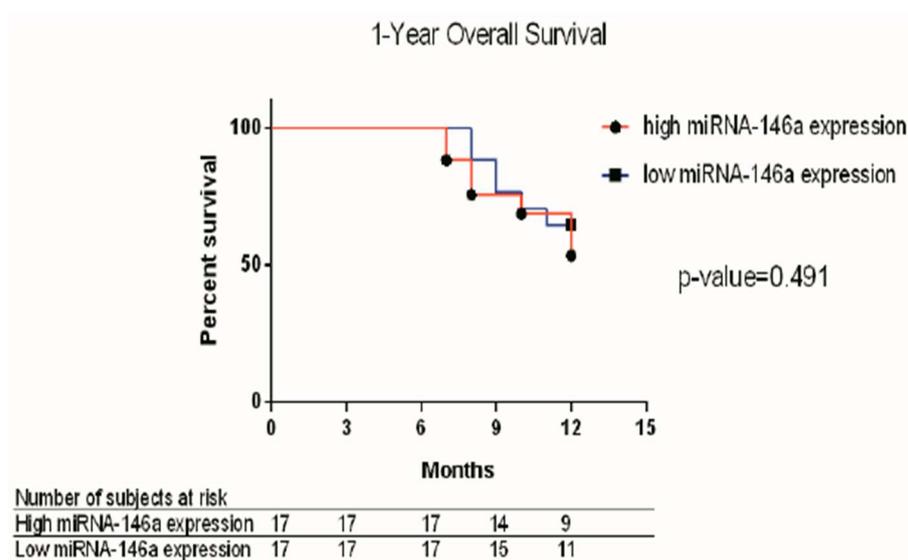


Рисунок 5. Анализ выживаемости методом Каплана–Мейера по результатам экспрессии микроРНК-146а.

Молекулярный анализ общих сигнальных каскадов показал, что исследуемые микроРНК участвуют в регуляции ключевых воспалительных и иммунных путей. МикроРНК-146а действует как критический регулятор NF-κB-зависимого сигналинга, непосредственно воздействуя на IRAK1 и TRAF6 — ключевые адаптерные белки в Toll-подобных рецепторах (TLR). Этот механизм формирует отрицательную обратную связь, где активация NF-κB индуцирует экспрессию микроРНК-146а, которая впоследствии подавляет компоненты того же пути, предотвращая избыточное воспаление.

Анализ ассоциации полиморфизма rs2910164 гена микроРНК-146а продемонстрировал, что у носителей генотипа CC и аллеля C отмечался более высокий риск развития тяжелых нежелательных явлений (3–4 степени по шкале CTCAE) в ходе терапии ИКТИ. (Таблица 1).

Таблица 1. Анализ ассоциации rs2910164 с риском развития токсичности различной степени по шкале CTCAE

Генотип/ Аллель	Степень токсичности 0-2 по шкале СТСАЕ (n=51) n (%)	Степень токсичности 3-4 по шкале СТСАЕ (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	

Кроме того, анализ экспрессии показал статистически значимое снижение уровня miRNA-146a ($p = 0,01$) у пациентов с СТСАЕ 3–4 степени по сравнению с пациентами с СТСАЕ 0–2 степени (Рисунок 6).

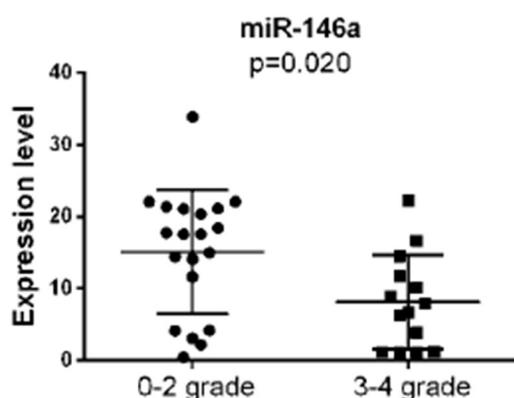


Рисунок 6. Уровень экспрессии микроРНК-146а у пациентов с иоНЯ различной степени тяжести.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые проведен анализ экспрессии экзосомальных микроРНК у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета и идентифицированы пять дифференциально экспрессируемых экзосомальных микроРНК.

Выявлена корреляция между степенью изменения экспрессии этих микроРНК и выраженностью ответа на терапию согласно критериям RECIST, что имеет важное клиническое значение. Критерии RECIST являются золотым стандартом оценки эффективности противоопухолевой терапии, и установление связи молекулярных маркеров с этими критериями повышает их практическую ценность. Валидация данных экспрессии микроРНК и обнаруженная корреляция между степенью изменения экспрессии и уровнем

метиляции генов микроРНК подтверждает уникальность и достоверность полученных данных.

Выявлена ассоциация генотипа СС и аллеля С полиморфного локуса rs2910164 гена микроРНК-146а с высоким риском развития нежелательных явлений при терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета, что представляет новое направление в персонализированной медицине.

Обнаруженная ассоциация пониженной экспрессии микроРНК-146а с высоким риском развития нежелательных явлений согласуется с ее ролью в регуляции воспалительного ответа.

Таким образом, выявленные микроРНК представляют собой взаимосвязанную регуляторную систему, координирующую множественные аспекты иммунного ответа против опухоли через общие сигнальные узлы, что подтверждает их потенциал как комплексных биомаркеров эффективности терапии ингибиторами контрольных точек при почечно-клеточном раке.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены 5 дифференциально экспрессируемых экзосомальных микроРНК у пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком до и после терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.
2. Выявлена корреляция между степенью изменения экспрессии этих микроРНК и выраженностью ответа на терапию (частичный или полный ответ согласно RECIST)
3. Проведена валидация данных экспрессии микроРНК и выявлена корреляция между степенью изменения экспрессии этих микроРНК и уровнем метилирования микроРНК.
4. Выявлена ассоциация генотипа СС и аллеля С полиморфного локуса rs2910164 гена микроРНК-146а с высоким риском развития нежелательных явлений (согласно критериям STCAE) при терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.
5. Выявлена ассоциация пониженной экспрессии микроРНК-146а с высоким риском развития нежелательных явлений (согласно критериям STCAE) .

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Асадуллина Д.Д.**, Измайлов А.А., Попова Е.В., Иванова Е.А., Измайлова С.В., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К., Гилязова И.Р. Роль микроРНК-34а в предсказании эффективности иммунотерапии при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме // Генетика. – 2026. –Т. 62, №1. Принята в печать.
2. **Асадуллина Д.Д.**, Гилязова И.Р., Иванова Е.А., Измайлова С.М., Гилязова Г.Р., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Экзосомальные микроРНК-146а и микроРНК-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.
3. Гилязова И.Р., **Асадуллина Д.Д.**, Иванова Е.А., Рахимов Р.Р., Измайлов 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.

4.Асадуллина Д.Д., Гилязова И.Р., Иванова Е.А., Рахимов Р.Р., Насретдинов А.Ф., Измайлов 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

5.Гилязова И.Р., Асадуллина Д.Д., Иванова Е.А., Измайлов 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 микроРНК 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.

Публикации в других изданиях:

1.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.

2.Гилязова И.Р., Измайлов 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.

3.Гилязова И.Р., Измайлов А.А., Иванова Е.А., Асадуллина Д.Д., Рахимов Р.Р., Султанбаев А.В., Насретдинов А.Ф., Измайлова А.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Роль экзосомальных микроРНК в прогнозировании ответа на терапию препаратами ИКТИ у пациентов с метастатической светлоклеточной почечно-клеточной карциномой // Вопросы Онкологии. –2023. –Т. 69, №3s. –С.116-117.

4.Асадуллина Д.Д., Иванова Е.А., Насретдинов А.Ф., Попова Е.В., Ермаков И.Б., Измайлов А.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К., Гилязова И.Р. Предикторы эффективности ингибиторов контрольных точек иммунного ответа при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме // Вопросы Онкологии. –2023. –Т. 69, № 3s. –С. 475-476.

5. 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](https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2022.06.004).

6.Иванова Е.А., Асадуллина Д.Д., Гилязова Г.Р., Рахимов Р.Р., Измайлов А.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К., Гилязова И.Р.. Ассоциация экспрессии экзосомальных микроРНК с терапией ингибиторами контрольных точек иммунитета при почечно-клеточной карциноме. // Биосистемы: Организация, Поведение, Управлению Тезисы докладов 76-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижний Новгород. – 2023. –С. 134.

7. Иванова Е.А., Гилязова И.Р, **Асадуллина Д.Д.**, Рахимов Р.Р., Гилязова Г.Р., Измайлов А.А., Павлов В.Н., Хуснутдинова Э.К. Ассоциация функционального полиморфного варианта микрорнк-146а с развитием иммуноопосредованных нежелательных явлений при почечно-клеточной карциноме. // Журнал Теоретической И Клинической Медицины. Издательство: Институт иммунологии Академии Наук Республики Узбекистан. –2022. –№ 4. –С. 172-173.