

*На правах рукописи*

**УТКИН ДМИТРИЙ ОЛЕГОВИЧ**

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАННЫХ ГЕНОВ  
микроРНК И РАСТВОРИМЫХ ФОРМ РЕЦЕПТОРА И ЛИГАНДА  
КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУНИТЕТА PD-1/PD-L1  
ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ**

3.1.6 Онкология, лучевая терапия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН

**Кушлинский Николай Евгеньевич**

**Официальные оппоненты:**

**Хохлова Светлана Викторовна** – доктор медицинских наук, заведующая онкологическим отделением противоопухолевой лекарственной терапии Института онкогинекологии и маммологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Стрельников Владимир Викторович** – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией эпигенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «23» ноября 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24.

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

Автореферат разослан «.....»..... 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Рак яичников (РЯ) – представляет группу крайне агрессивных опухолей женской репродуктивной системы, характеризуется трудностями ранней диагностики, частым выявлением опухоли с признаками диссеминации в третьей стадии заболевания и быстрым метастазированием. В Российской Федерации в структуре онкологических заболеваний среди женского населения РЯ занимает 9 место. Кроме того, РЯ характеризуется наиболее высокими показателями летальности среди всех злокачественных новообразований женской репродуктивной системы, ежегодно в России регистрируется более 8000 летальных исходов. По данным в структуре онкологической смертности среди женщин РЯ занимает 8 место [Каприн А.Д. и соавт., 2014; Заридзе Д.Г. и соавт., 2018].

С целью более углубленного понимания основ определенных этапов развития новообразований яичников в условиях свершившейся опухолевой трансформации клеток, важно изучение базовых биологических характеристик опухоли, а именно, конкретных молекул, связанных с механизмами регуляции скорости роста, пролиферативной активности, апоптоза, неоангиогенеза, а при РЯ – инвазивной способности и метастазирования. Все вышеуказанные биологические характеристики опухолевого процесса отражают не только «поведение» новообразования и его клинические проявления, но и связаны с ответом опухоли на терапию [Ahmed I. et al., 2016].

Известно, что в метастазирование РЯ вовлечено множество взаимосвязанных биологических процессов – повышение миграционной активности раковых клеток, эпителиально-мезенхимальный переход, разрушение внеклеточного матрикса, образование сфероидов, апоптоз, аутофагия, ангиогенез, формирование метастазов и появление асцита [Чикина А.С. и соавт., 2014; Брага Э.А. и соавт., 2017]. В обеспечении этих процессов важную роль играют регуляторные микроРНК [Брага Э.А. и соавт., 2017].

МикроРНК играют важную роль во многих фундаментальных биологических процессах, связанных с развитием и прогрессией злокачественных новообразований. Они могут подавлять экспрессию как драйверных онкогенов, так и супрессоров опухолевого роста, и, соответственно, могут функционировать и как супрессоры, и как онкогены [Lopez-Serra P. et al., 2012]. Получены данные о роли микроРНК и регулируемых ими генов-мишеней в патогенезе и метастазировании РЯ, причем они проявляют как про-метастатические, так и анти-метастатические свойства [Kinose Y. et al., 2014]. Экспрессия генов супрессорных и/или анти-метастатических микроРНК в опухолях может снижаться посредством метилирования CpG-островков (5'-цитозин-фосфат-гуанин-3') промоторных районов. Причем доля генов микроРНК, «выключенных» метилированием, выше, чем обычных генов, кодирующих белки [Kunej T. et al., 2011; Loginov V.I., 2015; Piletič K. et al., 2016]. В связи с этим гиперметилированные гены микроРНК могут служить высокоспецифичными и чувствительными диагностическими, и прогностическими маркерами РЯ [Teng Y., 2016; Muinao T. et al., 2018].

В последнее десятилетие значительный интерес к проблеме диагностики, лечения и оценки прогноза РЯ связывают с возможностью иммунотерапевтического воздействия на опухоль и ее метастазы, а именно, целенаправленное подавление активности одного из сигнальных путей, т.н. «контрольных точек иммунитета» - PD-1/PD-L1. Основные компоненты этой контрольной точки – рецептор программируемой гибели клетки 1 типа PD-1 (programmed cell death protein 1) и его лиганд PD-L1 рассматривают как молекулярные маркеры общего прогноза течения онкологических заболеваний и как маркеры выживаемости пациенток [Герштейн Е.С., и соавт., 2018]. В исследованиях последних лет показана положительная взаимосвязь экспрессии рецептора программируемой гибели клетки PD-1 и/или его лиганда PD-L1 при РЯ с распространенностью и степенью злокачественности опухоли [Кушлинский Н.Е и соавт., 2020].

Пристальный интерес у исследователей вызывает изучение растворимых

форм рецептора PD-1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1), обнаруженных относительно недавно в периферической крови, в том числе, и при некоторых онкологических заболеваниях. В литературе представлены единичные научные работы, в которых исследовали клиническую значимость и связь контрольных точек иммунитета у больных РЯ с экспрессией генов микроРНК и совсем не изучена их связь с маркерами гиперметилирования генов микроРНК [Кушлинский Н.Е и соавт., 2020]. В связи с этим полагаем, что настоящее исследование своевременно и актуально.

### **Цель исследования**

Изучить клиническую значимость метилирования и экспрессии группы генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) и их ассоциации с растворимыми формами рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в целях повышения эффективности диагностики и оценки прогноза рака яичников.

### **Задачи исследования**

1. Провести анализ концентрации растворимых форм рецептора программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганда sPD-L1 контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком яичников до лечения и сравнить их уровни у здоровых доноров группы контроля.

2. Оценить изменения уровня метилирования и экспрессии группы генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в опухолях и перитонеальных метастазах больных раком яичников с контрольной группой.

3. Изучить связь концентраций sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови и уровней метилирования и экспрессии группы генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в опухолях и перитонеальных метастазах больных раком яичников с основными клинико-морфологическими

характеристиками заболевания (стадия процесса, морфологический вариант рака яичников, степень дифференцировки опухоли).

4. Исследовать связь уровня метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях и перитонеальных метастазах больных раком яичников и их ассоциации с содержанием растворимых форм рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови пациенток.

5. Выявить связь уровней метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях и перитонеальных метастазах с концентрацией sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников с длительностью безрецидивной выживаемости, для выделения клинически значимых критериев диагностики и оценки прогноза рака яичников.

#### **Методология и методы исследования**

В исследование включены 93 женщины, больных РЯ, 10 женщин с пограничными опухолями яичников (ПОЯ), 22 больные доброкачественными опухолями яичников (ДОЯ), группу контроля составили 35 здоровых женщин. Методологической основой диссертационной работы является комплексное исследование содержания sPD-1, sPD-L1 в плазме крови, уровней метилирования и экспрессии 14 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в ткани опухоли и перитонеальных метастазов больных РЯ, а также ассоциации уровня метилирования группы генов микроРНК в опухоли с содержанием sPD-1, sPD-L1 в плазме крови, выполненных высокочувствительными иммуноферментными методами исследования, количественной МС-ПЦР (метилспецифичной полимеразной цепной реакции) и ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием современного оборудования.

В работе учитывали клинические и морфологические характеристики новообразований яичников на основании анализа общеклинических, рентгенологических и гистологических данных исследования. В диссертационном исследовании проводили статистический анализ показателей безрецидивной

выживаемости больных первичными злокачественными опухолями яичников (ЗОЯ) с учетом изучаемых лабораторных маркеров (уровней метилирования и экспрессии 14 генов микроРНК, sPD-1, sPD-L1).

### Научная новизна

В ходе выполнения диссертационной работы получены оригинальные результаты по исследованию растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 (sPD-1, sPD-L1), уровней метилирования и экспрессии генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) в ткани опухоли и метастазов, позволяющие в комплексе с клиническими и морфологическими данными повысить эффективность диагностики и оценки прогноза заболевания у больных новообразованиями яичников. Обнаружены статистически значимые отличия концентраций рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови здоровых женщин и больных доброкачественными опухолями, различия между пограничными, доброкачественными и злокачественными опухолями яичников не значимы. Уровни sPD-1 у больных РЯ не связаны с данными анамнеза, гистологическим строением опухоли, наличием опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, уровнями маркеров СА-125 и НЕ-4, не зависели от объема асцита, но статистически значимо возрастают при наличии диссеминатов опухоли по брюшине размером более 1 см.

Доказано, что концентрации sPD-L1 в плазме крови статистически значимо отражали стадию, критерии N и M системы TNM, значимо выше при наличии асцита и опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, связаны прямой корреляционной зависимостью с уровнями опухолевых маркеров СА-125 и НЕ-4 в крови, но не с концентрациями рецептора sPD-1.

Впервые у больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в первичной опухоли; показана ассоциация гиперметилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127* с прогрессированием РЯ и стадиями заболеваниями. Дальнейшее повышение уровня метилирования генов микроРНК *MIR-339* и *MIR-203* отмечено в

метастазах РЯ. При этом показана согласованность между процессами метилирования для попарных сочетаний генов микроРНК; в опухолях значимые корреляции отмечены для 29 попарных сочетаний генов микроРНК, а в метастазах – для 14 попарных сочетаний генов микроРНК; высоко значимые корреляции в опухолях выявлены для 3 пар генов микроРНК (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-129-2* и *MIR132*; *MIR-124a-2* и *MIR-127*), в метастазах – для 4 пар (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-9-1* и *MIR-34b*; *MIR-34c* и *MIR-9-1*; *MIR-129-2* и *MIR-132*). Эти данные свидетельствуют о возможном участии таких микроРНК в общих биологических процессах.

Обнаружена связь метилирования генов микроРНК в опухолях больных РЯ с клиническими факторами заболевания: для 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; для 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR132* – с диссеминацией по брюшине; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.

Впервые показано, что уровни метилирования генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в опухоли связаны значимой линейной зависимостью с концентрациями sPD-L1 в плазме крови больных РЯ, наиболее тесной с *MIR-124a-2*. Многофакторный анализ показал, что стадия заболевания и уровни sPD-1 следует считать независимыми факторами прогноза при РЯ.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные биохимические данные с учетом клинико-морфологических характеристик РЯ позволили утверждать объективную значимость исследованных маркеров в диагностике и оценке прогноза заболевания.

Показано, что при однофакторном анализе безрецидивную выживаемость больных РЯ статистически значимо определяли: дифференцировка опухоли, стадия заболевания, наличие метастазов в большом сальнике, диссеминация по брюшине при размере диссеминатов более 1 см, наличие асцита и уровни маркера HE-4. Факторы анамнеза больных РЯ не определяли сроки развития рецидива. Значимо худшая безрецидивная выживаемость отмечена при не оптимальной

операции. Многофакторный анализ показал, что стадия заболевания и уровни sPD-1 следует считать независимыми факторами прогноза при РЯ.

Впервые показано, что исходные уровни растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 рецептор программируемой гибели клеток sPD-1 и его лиганд sPD-L1 в плазме крови больных РЯ связаны с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразования, что позволяет использовать показатели указанных опухолевых маркеров при обследовании этой категории пациенток с целью оценки прогноза заболевания. По результатам исследования уровней рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови можно предсказать с высокой долей вероятности длительность безрецидивной выживаемости у больных РЯ. Концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл, sPD-L1 более 22 пг/мл, уровни метилирования генов микроРНК *MIR-9-1*, *MIR-124a-2*, *MIR-34b* в опухоли статистически значимо связаны с низкими показателями 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЯ.

#### **Личный вклад**

Автором самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, касающейся проблемы уровней метилирования и экспрессии генов микроРНК в ткани первичной опухоли и перитонеальных метастазов, а также биохимических маркеров (sPD-1, sPD-L1) у больных РЯ. Создана база данных и разработан дизайн исследования. Автор принимал участие в сборе биологического материала, практическом ведении и лечении больных, изучении отдаленных результатов лечения, безрецидивной выживаемости. Статистическая обработка данных, интерпретация полученных результатов, оформление диссертации.

#### **Соответствие паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований: п.2. Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии,

иммунологии, биохимии, биофизики и др.); п.3. Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики онкологических заболеваний.

### **Положения выносимые на защиту**

1. Концентрации рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 в плазме крови больных пограничными и злокачественными опухолями яичников статистически значимо не отличаются от здоровых женщин. Концентрации рецептора sPD-1 и его лиганда sPD-L1 при РЯ достоверно связаны с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразований.
2. У больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в опухоли и показана связь метилирования генов микроРНК с клиническими факторами заболевания: для 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; для 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR-132* – с диссеминацией опухоли по брюшной полости; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.
3. Уровни метилирования генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в опухоли связаны значимой линейной зависимостью с концентрациями sPD-L1 в плазме крови больных РЯ. Связь концентраций sPD-L1 с уровнем метилирования изучаемых генов микроРНК в метастазах отсутствовала.
4. Концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл, sPD-L1 более 22 пг/мл, уровни метилирования генов микроРНК *MIR-9-1*, *MIR-124a-2*, *MIR-34b* в опухоли статистически значимо связаны с низкими показателями 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЯ.

### **Внедрение результатов исследования**

Полученные результаты и рекомендации внедрены в практическую деятельность работы Централизованного научно-клинического лабораторного отдела ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Акт внедрения от 18.05.2023г.).

### **Апробация**

Апробация диссертации состоялась на совместной научной конференции лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей, лаборатории биологии стромальных клеток опухолей НИИ канцерогенеза и Консультативно-диагностического центра ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, состоявшейся 9 июня 2023 года.

Материалы диссертации представлены на: III Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 6-8 декабря 2017 г.); XII International Congress on Reproductive Medicine (Moscow, January 16-19 2018); XXIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Традиции и новации клинической лабораторной диагностики» (Москва, 20-22 марта 2018 г.); конференции, посвященной памяти советского и российского ученого Гарри Израйлевича Абелева «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 27-29 июня 2018 г.); IV Российском Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 3-5 октября 2018 г.); V Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2019» (Санкт-Петербург, 20-23 июня 2019 г.); XXVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Клиническая лаборатория: от аналитики к диагнозу» (Москва, 12-14 мая 2021 г.).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликованы 13 печатных работ, 9 из них в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы «Материалы и методы исследования», 3 глав собственных результатов исследования, заключения и обсуждения полученных результатов, практических рекомендаций, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 203 источника, из них 15 отечественных и 188 зарубежных. Работа

иллюстрирована 62 таблицами и 33 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### Характеристика больных опухолями яичников

В исследование включены 93 женщины, больных РЯ, 10 женщин с пограничными опухолями яичников и 22 больные с доброкачественными опухолями яичников, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В качестве группы контроля обследовали 35 практически здоровых женщин. Диагноз всем больным выставлен на основании гистологического заключения. В таблице 1 представлены возрастные характеристики обследованных женщин основных групп.

**Таблица 1** – Возрастные характеристики обследованных женщин основных групп

Группы	N	Возраст, лет		P	Менопауза
		M±m	Пределы		
<sup>0</sup> Контроль	35	42,9±2,3	18-68	0vs3<0,0001 1vs3=0,06; 2vs3=0,018	11 (31,4%)
<sup>1</sup> Больные ДОЯ	22	49,7±3,5	18-74		12 (54,6%)
<sup>2</sup> Больные ПОЯ	10	45,4±4,8	26-72		4 (40,0%)
<sup>3</sup> Больные ЗОЯ	93	55,4±1,1	32-78		68 (73,1%)

При оценке распределения больных РЯ с учетом стадии заболевания преобладали больные с ПС стадией (45,1%). А также соответствующие серозному варианту гистологического строения опухоли (79,5%). Больше, чем у половины пациенток (58,1%) опухоль была низкодифференцированной. У 53,8% больных выявлен асцит, у 46,2% пациенток асцит не определялся.

В таблице 2 представлено распределение больных РЯ по объему хирургического вмешательства.

**Таблица 2 – Распределение больных раком яичников по виду хирургического вмешательства**

Вид хирургического вмешательства	Частота Абс., (Отн.)
Полная	46 (49,5%)
Оптимальная	21 (22,6%)
Не оптимальная	26 (27,9%)

Химиотерапию по схеме паклитаксел+карбоплатин (ТСб) получили 56 пациенток, 14 – химиотерапию по схеме ТСб +авастин, 9 - по схеме циклофосфан+доксорубицин+цисплатин (САР), 6 пациенток получили карбоплатин в монорежиме и 1 – по схеме – СР (циклофосфан+цисплатин).

### **Клинико-лабораторные методы обследования**

#### **Определение концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови.**

Концентрацию sPD-L1 и sPD-1 измеряли в образцах плазмы крови здоровых доноров и больных РЯ, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью реактивов прямого иммуноферментного анализа Human PD-L1 Platinum ELISA и Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) согласно инструкциям производителя. Автоматическим иммуноферментным анализатором ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия) выполняли измерения. Уровень маркеров отображали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

**Анализ метилирования генов микроРНК методом МС-ПЦР с детекцией в реальном времени.** Использовали бисульфитную конверсию ДНК 0,5-2 мкг. Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при -20°C и использовали в качестве матрицы при проведении количественной МС-ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов «qPCRmix-HS SYBR» и по протоколу фирмы Евроген. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК оценивалось для каждой

пары праймеров. Для контроля неметилованных аллелей применяли специальный препарат ДНК #G1471 (Promega, США). Контроль позитивного 100% метилирования осуществляли препаратом ДНК #SD1131 (Thermo Scientific, США).

**Определение экспрессии генов микроРНК методом TaqMan МС-ПЦР.** После определения комплексной РНК производили реакцию обратной транскрипции с использованием TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, США) с целью получения комплементарной (кДНК). Полученную кДНК применяли для изучения уровня экспрессии генов микроРНК.

**Статистический анализ полученных результатов.** Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значительно отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квантили и применяли непараметрические методы сравнения. Для несвязанных признаков при количестве групп более двух,  $p$  рассчитывали с применением непараметрического варианта дисперсионного анализа Kruskal-Wallis ANOVA & Median test и Mann-Whitney U test при сопоставлении двух групп.

Сравнения связанных значений выполняли с применением непараметрических методов анализа Wilcoxon matched pairs test и Kendall's concordance. Для расчета пороговых значений вычисляли 95% доверительные интервалы показателей. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . При сравнении частот строили таблицы сопряженности признаков. Для расчета  $p$  использовали точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий  $\chi^2$ . Проводили корреляционный анализ Spearman для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В таблице 3 представлены данные по содержанию sPD-1 и sPD-L1 у больных разных групп и в контроле.

**Таблица 3** – Содержание sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных новообразованиями яичников разных групп и в контроле

Группа/ Маркер	N	Пределы	95% ДИ	Медиана	Квартили	P (Kruskal-Wallis)
sPD-1, пг/мл						
<sup>0</sup> Контроль	35	19,1-66,4	22,7-65,3	43,8	33,7-54,6	p <sub>0vs1</sub> =0,004; p <sub>0vs2</sub> =0,39; p <sub>0vs3</sub> =0,32; p <sub>1vs3</sub> =0,22; p <sub>2vs3</sub> =0,12; p <sub>1vs2</sub> =0,03
<sup>1</sup> ДОЯ	22	32,1-150	32,8-126	51,4	44,9-85,3	
<sup>2</sup> ПОЯ	10	30,2-52,9	30,2-52,9	39,2	30,9-45,8	
<sup>3</sup> ЗОЯ	93	18,6-219	25,0-107	49,9	37,8-64,3	
sPD-L1, пг/мл						
<sup>0</sup> Контроль	35	7,6-149	24,7-110	60,9	26,2-91,7	p <sub>0vs1</sub> =0,004; p <sub>0vs2</sub> =0,093; p <sub>0vs3</sub> =0,37; p <sub>1vs3</sub> =0,032; p <sub>2vs3</sub> =0,23; p <sub>1vs2</sub> =0,9
<sup>1</sup> ДОЯ	22	5,9-154	12,9-88,8	22,2	14,0-49,8	
<sup>2</sup> ПОЯ	10	10,3-113	10,8-113	24,7	12,4-61,8	
<sup>3</sup> ЗОЯ	93	0-176	11,9-121	44,4	22,2-84,7	

Таким образом, sPD-1 не следует использовать как онкомаркер РЯ, но высокий уровень маркера более 65 пг/мл (верхний 95% ДИ в контроле) может свидетельствовать об опухолевом заболевании яичников. Пороговых значений sPD-L1, статистически достоверно разделяющих обследованные группы, не обнаружили. Таким образом, sPD-L1, измеренный в плазме крови больных новообразованиями яичников, не может применяться как онкомаркер.

Не установлено значимой связи концентраций sPD-1 и sPD-L1 у больных РЯ с возрастом, сопутствующими соматическими заболеваниями, возрастом менархе, наличием родов и абортов в анамнезе.

В группе больных с IV стадией наблюдали статистически значимое

увеличение медианы sPD-1 (69,5 пг/мл,  $p=0,006$ ). В тоже время, обнаружено статистически значимое повышение концентраций sPD-L1 в плазме крови больных РЯ при увеличении распространенности опухолевого процесса с 17,9 до 82,0 пг/мл ( $p=0,0001$ ).

Таким образом, при увеличении стадии РЯ обнаружено достоверное повышение частоты выявления значений sPD-1 в плазме крови, превышающих верхний его порог в контроле. Аналогичная зависимость отмечена нами при анализе частоты выявления значений sPD-L1  $\geq 60$  пг/мл в плазме крови больных ЗОЯ. Так, при увеличении стадии РЯ частота выявления уровней sPD-L1  $\geq 60$  пг/мл статистически значимо повышалась с 20,0-21,7% при I-II стадиях до 46,5% при III стадии и до 100% при IV стадии ( $p=0,02$ ).

В таблице 4 представлены данные по содержанию исследованных маркеров в плазме крови больных РЯ в зависимости от наличия и отсутствия метастазов в большом сальнике.

**Таблица 4** – Концентрации sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных раком яичников в зависимости от наличия метастазов в большом сальнике

Наличие метастазов в большом сальнике	N	sPD-1, пг/мл	sPD-L1, пг/мл
		Медиана; квартили	Медиана; квартили
Не обнаружены	35	47,9; 35,5-56,5	23,7; 9,7-53,2
Обнаружены	58	58,0; 42,1-72,1	44,4; 27,7-82,0
P		0,006; M-W test	0,005; M-W test

Достоверно бóльшие концентрации как sPD-1, так и sPD-L1 выявлены в группе пациенток с наличием метастазов в большом сальнике. При этом, медиана и квартили sPD-1 у 14 больных ЗОЯ с метастазами размерами менее 2 см равнялась 53,0 (42,1-68,0) пг/мл, у 41 пациенток с метастазами до 5 см - 50,3 (41,7-72,1) пг/мл и были значительно выше у больных с «панцирным» сальником 70,6 (65,8-89,9) пг/мл. Концентрации sPD-L1 в указанных группах равнялись 25,3 (21,2-42,5) пг/мл; 48,3 (35,1-66,1) пг/мл; 108 (44,4-121) пг/мл, соответственно.

Частота выявления «высоких» значений sPD-1 >65 пг/мл в плазме крови больных ЗОЯ была наименьшей в группе с отсутствием диссеминации опухолевого процесса и составила 15,6% (5 из 32), увеличивалась более чем в 2 раза до 30,8% (12 из 39) в группе с просовидной диссеминацией и значительно увеличивалась до 40,9% (9 из 22) при размерах диссеминатов более 1,0 см в диаметре ( $p=0,15$ ).

Таким образом, значимое повышение концентрации sPD-1 наблюдали в плазме крови больных РЯ при диссеминации опухолевого процесса по брюшине (диссеминаты размером 1,0 см) и при увеличении распространенности опухолевого процесса (критерий ТЗС), незначимое - при отдаленных метастазах и метастазах в большом сальнике.

Повышение концентрации sPD-L1 статистически значимо отражало стадию заболевания, размеры первичной опухоли, наличие метастазов в большом сальнике, наличие опухолевых клеток в смывах из брюшной полости. Незначимое увеличение концентрации этого маркера в плазме крови больных РЯ наблюдали при диссеминации опухолевого процесса по брюшине. Частота выявления концентраций sPD-L1  $\geq 60$  пг/мл была статистически значимо выше в группе больных ЗОЯ с наличием асцита, а также при объемах асцитической жидкости от 3 л и более. Многофакторный анализ показал, что в наибольшей степени концентрация sPD-L1 в плазме крови больных РЯ связана с размерами первичной опухоли ( $p=0,01$ ), наличием асцита ( $p=0,012$ ) и отдаленных метастазов ( $p=0,042$ ).

Такие важные клинические признаки РЯ как степень дифференцировки опухоли и гистологический вариант строения опухоли не были статистически значимо связаны с концентрациями sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови больных.

### **Уровни метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в ткани опухоли и метастазов больных раком яичников**

Уровни метилирования 14 генов микроРНК определены в ткани опухоли 26 больных, а также в 15 образцах неизмененной ткани яичников и в 19 образцах метастазов РЯ. У больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из

14 генов микроРНК в первичной опухоли и наблюдали дальнейшее повышение уровня метилирования ряда генов микроРНК в метастазах РЯ. Наибольший уровень метилирования в опухоли больных РЯ в сравнении с гистологически неизменной тканью яичников отмечен у 3-х генов микроРНК *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*. Этот результат указывает на ассоциацию гиперметилирования этих генов микроРНК с процессом развития РЯ. У большинства больных РЯ выявлено многократное превышение уровня метилирования гена микроРНК *MIR-125b-1* в ткани опухоли.

Как следует из данных таблицы 5, дисперсионным анализом подтверждено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение уровня метилирования группы из 9-и генов микроРНК в опухоли больных РЯ при увеличении стадии заболевания: *MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*.

**Таблица 5** – Уровни метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников различных стадий

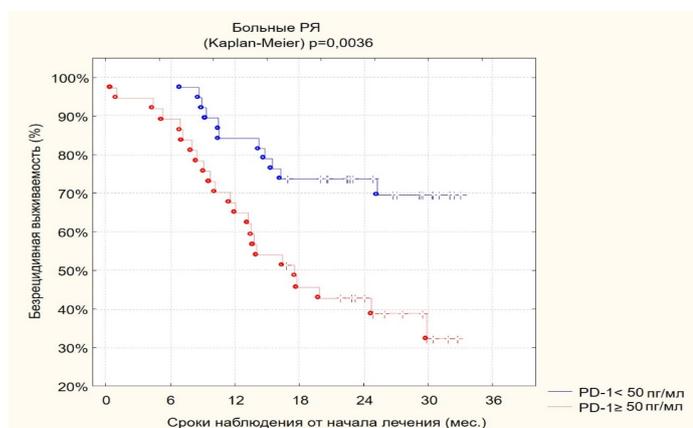
микроРНК в ткани опухоли	Стадия заболевания			P
	<sup>1</sup> IC (n=5)	<sup>2</sup> ПА, ПВ, ША (n=4)	<sup>3</sup> ШС (n=17)	
	Метилирование генов микроРНК			
	Медиана; квартили	Медиана; квартили	Медиана; квартили	
<i>MIR-124a-2</i>	5,0; 2,0-5,2	38,7; 29,5-95,6	56,4; 36,6-94,4	0,004
<i>MIR-124-3</i>	13,1; 7,2-17,9	27,3; 29,5-31,0	20,2; 12,8-32,7	0,22
<i>MIR-125b-1</i>	8,8; 4,9-11,4	37,7; 23,3-38,6	50,2; 23,1-84,0	0,054; <sub>1vs3</sub> 0,02
<i>MIR-127</i>	4,8; 3,8-7,9	67,3; 36,4-80,2	37,0; 29,1-61,9	0,014
<i>MIR-129-2</i>	5,6; 3,1-5,7	26,7; 20,3-31,0	36,0; 21,4-51,5	0,036
<i>MIR-132</i>	13,6; 6,3-30,4	16,6; 6,5-36,3	26,9; 3,7-50,0	0,6
<i>MIR-137</i>	7,7; 2,7-9,4	15,7; 14,3-43,6	20,9; 13,5-31,9	0,15

MIR-203a	6,7; 4,0-7,3	20,5; 5,0-35,3	3,3; 1,6-16,6	0,16
MIR-34b	0,2; 0,1-1,5	7,7; 0,7-18,1	13,3; 11,3-19,5	0,032
MIR-34c	1,3; 1,2-2,1	7,2; 2,7-18,2	13,8-11,2-20,1	0,014
MIR-375	1,8; 1,0-10,9	12,0; 11,0-17,0	18,6; 11,8-26,0	0,06; <sub>1vs3</sub> 0,02
MIR-9-1	0,6; 0,5-5,6	20,7; 0,6-20,8	13,0; 9,1-21,4	0,007
MIR-9-3	8,6; 2,3-8,7	7,2; 2,7-7,6	38,8; 18,7-50,4	0,045
MIR-339	3,9; 3,8-3,9	21,5; 12,5-26,5	22,5; 7,9-43,8	0,009

### Отдаленные результаты лечения

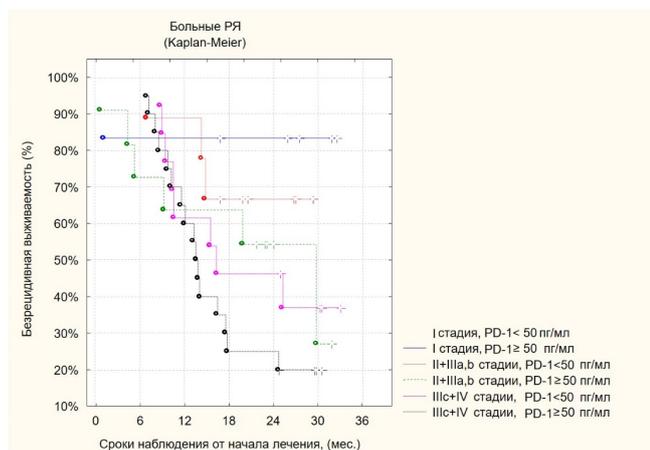
При многофакторном анализе с включением в модель основных клинических признаков фактором, значимо определяющим безрецидивную выживаемость больных РЯ, была только стадия заболевания ( $p=0,0037$ ). Степень дифференцировки определяла отдаленные результаты лечения больных в меньшей степени ( $p=0,24$ ).

Наилучшее разделение больных ЗОЯ по безрецидивной выживаемости получено при пороговом значении sPD-1, равном его медиане (50 пг/мл) (Рисунок 1). При этом 1-летняя безрецидивная выживаемость в группе больных РЯ с концентрациями sPD-1 от 50 пг/мл и более значимо снижалась на 16,6%, 2-летняя - на 30,9% и 3-летняя - на 37,2%.



**Рисунок 1** – Безрецидивная выживаемость больных РЯ при уровнях sPD-1 менее и более 50 пг/мл в плазме крови пациенток до лечения

Результаты многофакторного анализа позволяют сделать вывод о том, что определение концентрации sPD-1 в плазме крови больных РЯ до лечения можно использовать для уточнения прогноза заболевания. Дополнительный анализ подтвердил достоверность данного вывода (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Безрецидивная выживаемость больных РЯ в зависимости от стадии и sPD-1 <math>< 50</math> и

## ВЫВОДЫ

1. Концентрации рецептора sPD-1 в плазме крови здоровых женщин статистически значимо ниже, чем у больных ДОЯ и не отличались от больных РЯ. Различия в уровнях sPD-1 между больными ДОЯ и РЯ не значимы. При этом уровни sPD-1 у больных РЯ не связаны с данными анамнеза, гистологическим строением опухоли, наличием опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, уровнями маркеров СА-125 и НЕ-4, не зависели от объема асцита, но было статистически значимо выше при наличии диссеминатов опухоли по брюшине размером более 1 см. Многофакторный анализ показал, что стадия заболевания и уровни sPD-1 следует считать независимыми факторами прогноза при РЯ.

2. Концентрации sPD-L1 в плазме крови больных ДОЯ статистически значимо ниже, чем в контроле, не различались в ПОЯ и ДОЯ, а при РЯ не отличались от контроля и достоверно выше, чем в ДОЯ; не связаны с данными анамнеза и гистологическим строением опухоли, но значимо отражали стадию, критерии N и M. При этом, уровни sPD-L1 не различались в группах больных РЯ с отсутствием

и наличием диссеминатов по брюшине размером более 1,0 см, достоверно выше при наличии асцита и опухолевых клеток в смывах из брюшной полости, связаны прямой корреляционной зависимостью с уровнями маркеров СА-125 и НЕ-4, но не с концентрациями sPD-1.

3. У больных РЯ выявлено повышение уровня метилирования 11 из 14 генов микроРНК в первичной опухоли; показана ассоциация гиперметилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127* с развитием РЯ; дальнейшее повышение уровня метилирования отмечено в метастазах РЯ для генов микроРНК *MIR-339* и *MIR-203*. При этом, показана согласованность между процессами метилирования для 29 пар генов микроРНК в опухолях и для 14 пар генов микроРНК в метастазах РЯ; в опухолях значимые корреляции отмечены для 29 пар генов микроРНК, а в метастазах – для 14 пар микроРНК; высоко значимые корреляции в опухолях выявлены для 3 пар генов микроРНК (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-129-2* и *MIR-132*; *MIR-124a-2* и *MIR-127*), в метастазах – для 4 пар (*MIR-34b* и *MIR-34c*; *MIR-9-1* и *MIR-34b*; *MIR-129-2* и *MIR-132*).

4. Показана связь метилирования генов микроРНК в опухолях больных РЯ с клиническими факторами заболевания: для 9 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b*, *MIR-34c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – со стадией; для 6 генов (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) – с наличием метастазов в большом сальнике; гена *MIR-132* – с диссеминацией по брюшине; гена *MIR-375* – со снижением степени дифференцировки новообразования.

5. Уровни метилирования генов *MIR-124a-2*, *MIR-34b*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* в опухоли связаны значимой линейной зависимостью с концентрациями sPD-L1 в плазме крови больных РЯ, наиболее тесной с *MIR-124a-2*. Связь концентраций sPD-L1 с уровнем метилирования изучаемых генов микроРНК в метастазах отсутствовала. Уровни метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-34b* в опухоли больных РЯ статистически значимо различались у пациенток с концентрациями sPD-L1 менее и более 60 пг/мл в плазме крови.

6. Установлено снижение экспрессии 12 генов микроРНК (*MIR-124a*, *MIR-127*, *MIR-129*, *MIR-132*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-125-b*, *MIR-137*, *MIR-203*, *MIR-375*,

*MIR-34b*, *MIR-339*) в опухолях больных РЯ относительно нормальной ткани яичников, что соответствует гиперметилированию их генов и подтверждает функциональную роль метилирования в подавлении экспрессии этих генов микроРНК. При этом подавление экспрессии гиперметилируемых опухолевых супрессорных микроРНК ассоциировано с некоторыми характеристиками прогрессии РЯ: снижением степени его дифференцировки (ген *MIR-127*), при выявлении асцита (ген *MIR-34b*) и диссеминации опухоли по брюшине (ген *MIR-127*). При этом, статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *MIR-339* в опухолях ассоциировано со снижением уровня sPD-1 в плазме крови, что подтверждает возможную вовлеченность некоторых микроРНК в регуляцию контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1.

7. Концентрации sPD-1 в плазме крови  $\geq 50$  пг/мл, sPD-L1  $\geq 22$  пг/мл, повышенные уровни метилирования генов *MIR-9-1* ( $>9\%$ ), *MIR-124a-2* ( $>30\%$ ), и сниженный уровень экспрессии *MIR-9-1* ( $\leq -1,7$ ) опухоли статистически значимо связаны с низкими показателями безрецидивной 3-летней выживаемости больных РЯ.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Врачам онкологам, гинекологам, клинической лабораторной диагностики, работающим в специализированных онкологических стационарах, рекомендуется:

1. В качестве дополнительных лабораторных маркеров оценки прогноза безрецидивной выживаемости больных РЯ исследовать в плазме крови иммуноферментным методом исходные уровни растворимых форм контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 – рецептора программируемой гибели клетки sPD-1 и его лиганда sPD-L1, для выявления группы риска. Значимыми факторами неблагоприятного прогноза 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЯ следует считать концентрации sPD-1 в плазме крови более 50 пг/мл, а sPD-L1 более 22 пг/мл.

2. Исследовать до начала лечения уровни метилирования генов микроРНК *MIR-9-1*, *MIR-124a-2* в ткани опухоли с помощью метода

количественной метилспецифичной ПЦР с детекцией в реальном времени, так как повышенные уровни этих маркеров являются независимыми и статистически значимо связанными факторами с низкими показателями 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЯ.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Брага Э.А. Пять гиперметилированных генов микроРНК как потенциальные маркеры рака яичников / Э.А. Брага, В.И. Логинов, А.М. Бурдённый, Е.А. Филиппова, И.В. Пронина, С.В. Куревлев, Т.П. Казубская, Д.Н. Кушлинский, **Д.О. Уткин**, В.Д. Ермилова, Н.Е. Кушлинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164. – № 9. – С. 335-340.

2. Брага Э.А. Диагностическое значение группы генов микроРНК, гиперметилированных в карциноме яичников / Э.А. Брага, В.И. Логинов, Е.А. Филиппова, А.М. Бурдённый, И.В. Пронина, Т.П. Казубская, Д.С. Ходырев, **Д.О. Уткин**, Д.Н. Кушлинский, Л.В. Адамян, Н.Е. Кушлинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166. – № 8. – С. 213-217.

3. Филиппова Е.А. Гиперметилированные гены микроРНК в карциноме яичников: системы маркеров прогноза метастазирования / Е.А. Филиппова, В.И. Логинов, А.М. Бурденный, Э.А. Брага, И.В. Пронина, Т.П. Казубская, Д.Н. Кушлинский, **Д.О. Уткин**, М.В. Фридман, Д.С. Ходырев, Н.Е. Кушлинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167. – № 1. – С. 86-90.

4. Кушлинский Н.Е. Клиническая значимость метилирования группы генов микроРНК у больных раком яичников / Н.Е. Кушлинский, **Д.О. Уткин**, В.И. Логинов, Е.А. Филиппова, А.М. Бурдённый, Д.Н. Кушлинский, И.В. Пронина, Э.А. Брага // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65. – № 5. – С. 321-327.

5. Кушлинский Н.Е. Основные компоненты сигнального пути контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями яичников: клинико-морфологические

корреляции / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн, **Д.О. Уткин**, Н.А. Петрикова, Д.Н. Кушлинский, М.А. Шабанов, М.М. Хуламханова, Л.А. Ашрафян, И.С. Стилиди // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 6. – С. 80-88.

6. Кушлинский Н.Е. Новые микроРНК как потенциальные регуляторы контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 и прогностический потенциал метилирования MIR9-1 и MIR124-2 при раке яичников / Н.Е. Кушлинский, В.И. Логинов, **Д.О. Уткин**, Е.А. Филиппова, А.М. Бурденный, Е.А. Короткова, И.В. Пронина, С.С. Лукина, А.В. Смирнова, Е.С. Герштейн, Э.А. Брага // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – № 6. – С. 990-996.

7. Лукина С.С. Синергизм между уровнями метилирования наборов генов микроРНК в первичных опухолях и метастазах больных раком яичников / С.С. Лукина, А.М. Бурдённый, Е.А. Филиппова, И.В. Пронина, Н.А. Иванова, Т.П. Казубская, Д.Н. Кушлинский, **Д.О. Уткин**, В.И. Логинов, Э.А. Брага, Н.Е. Кушлинский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173. – № 1. – С. 103-107.

8. Loginov V.I. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis / V.I. Loginov, I.V. Pronina, A.M. Burdennyu, E.A. Filippova, **D.O. Utkin**, T.P. Kazubskaya, D.N. Kushlinsky, D.S. Khodyrev, N.E. Kushlinskii, A.A. Dmitriev, E.A. Braga // Gene. – 2018. – V. 662. – С. 28-36.

9. Braga E.A. Diagnostic Value of a Group of MicroRNA Genes Hypermethylated in Ovarian Carcinoma / E.A. Braga, V.I. Loginov, E.A. Filippova, A.M. Burdennyi, I.V. Pronina, T.P. Kazubskaya, **D.O. Utkin**, D.S. Khodyrev, D.N. Kushlinsky, L.V. Adamyan, N.E. Kuslinskii // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2018. – V. 166. – N 2. – С. 253-256.