

МАЛОИНВАЗИВНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА СЕРОЗНОЙ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

М.Р. Цандекова, Н.В. Порханова, О.И. Кит, Д.С. Кутилин

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

Цель исследования. Лабораторный скрининг маркеров для дифференциальной малоинвазивной диагностики разных молекулярных подтипов серозной аденокарциномы яичника.

Материалы и методы. Проведено комплексное клиническое и молекулярно-генетическое обследование 100 больных серозной аденокарциномой яичника и 30 доноров без онкологической патологии. Для получения внеклеточной ДНК (внДНК) использовали кровь, полученную в процессе венопункции. Выделение внДНК осуществляли фенол-хлороформным методом. Оценку показателя относительной копийности генов проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). Для оценки различных значений количественных показателей применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни, для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Идентификация общих сигнальных путей исследуемых генов проводилась с помощью алгоритма «сетевой интеграции нескольких ассоциаций». Для выбора минимального набора генов и создания предсказательных моделей использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию.

Результаты. Обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение числа копий генов *SULT1-E1*, *CYP1-B1* и *ESR1* во внДНК у больных серозной аденокарциномой яичников высокой степени злокачественности относительно внДНК плазмы крови условно здоровых доноров. Обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генетических локусов *PTEN* и *BCL2* и снижение числа копий генов *BAX* и *CASP-3* во внДНК у больных серозной аденокарциномой яичников низкой степени злокачественности относительно внДНК плазмы крови условно здоровых доноров. На основании bootstrap-моделей получена финальная панель генов: *PTEN/SULT1E1*, *ESR1/BCL2*, *PTEN/BCL2*, *BAX/BCL2*, *ESR1/BAX*, *PTEN/BAX*, *CYP1B1/ESR1*.

Заключение. Проведенное исследование позволило выделить на молекулярно-генетическом уровне подтипы серозной аденокарциномы яичников низкой и высокой степени злокачественности. Одновременное определение показателей копийности генов *PTEN*, *SULT1E1*, *ESR1*, *BAX*, *BCL2* и *CYP1B1* во внДНК плазмы крови позволяет выявлять больных серозной аденокарциномой яичника двух групп — низкой и высокой степени злокачественности. Полученные результаты открывают большие перспективы для персонализированного подхода к лечению этих опухолей.

Ключевые слова: серозная аденокарцинома яичника, молекулярные подтипы, копийность генов, внеклеточная ДНК.

MINIMALLY INVASIVE MOLECULAR DIAGNOSIS OF HIGH-GRADE AND LOW-GRADE SEROUS ADENOCARCINOMA OF THE OVARY

M.R. Tsandekova, N.V. Porkhanova, O.I. Kit, D.S. Kutilin

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

Objective of the study is to carry out a laboratory screening of the markers for differential minimally invasive diagnosis of various molecular subtypes of serous ovarian adenocarcinoma.

Materials and Methods. A comprehensive clinical, molecular and genetic examination of 100 patients with serous ovarian carcinoma and of 30 donors without oncologic diseases was conducted. Blood samples collected in venipuncture procedure were used to obtain extracellular DNA (exDNA). DNA extraction was performed using phenol-chloroform method. Determination of relative gene copy number was carried out using real-time quantitative polymerase-chain reaction (RT-qPCR). Non-parametric Mann-Whitney U-test was used for the evaluation of differences in quantitative indicators, and Bonferroni correction — to counteract the problem of multiple comparisons. Identification of common signaling pathways of genes

under study was performed using “multiple association network integration” algorithm. LASSO — penalized logistic regression was used for the choice of minimal gene set and for the creation of predictive models.

Results. Statistically significant ($p < 0,005$) increase of *SULT1-E1*, *CYP1-B1* and *ESR1* gene copy numbers in extracellular DNA (exDNA) in patients with high-grade serous ovarian carcinoma relative to blood serum extracellular DNA (exDNA) of conditionally healthy donors was found. Statistically significant increase ($p < 0,05$) in *PTEN* and *BCL2* gene loci copy numbers and a decrease in *BAX* and *CASP-3* gene copy numbers in extracellular DNA (exDNA) in patients with low-grade serous ovarian adenocarcinoma relative to blood serum extracellular DNA (exDNA) of conditionally healthy donors was revealed. A final panel of genes *PTEN/SULT1E1*, *ESR1/BCL2*, *PTEN/BCL2*, *BAX/BCL2*, *ESR1/BAX*, *PTEN/BAX*, *CYP1B1/ESR1* was obtained based on bootstrap models.

Conclusion. The study allowed to identify subtypes of low-grade and high-grade serous ovarian adenocarcinoma on molecular genetic level. Simultaneous determination of indicators of *PTEN*, *SULT1E1*, *ESR1*, *BAX*, *BCL2* and *CYP1B1* gene copy numbers in extracellular DNA (exDNA) of blood serum permits to identify patients with serous ovarian adenocarcinoma of two types — low-grade and high-grade of malignancy. The results of the study provide great opportunities for personalized approach to the treatment of these tumors.

Keywords: serous ovarian carcinoma, molecular subtype, gene copy number, extracellular DNA.

Введение

Серозная аденокарцинома — наиболее распространенный подтип рака яичников. Смертность от данной патологии находится на самом высоком уровне среди всех гинекологических опухолей в мире и каждый год увеличивается [1]. К 2015 г. онкологами уже было установлено, что рак яичников является гетерогенным заболеванием и на гистологическом, и на молекулярном уровнях [2].

Серозная аденокарцинома низкой степени злокачественности (нзСА, low-grade serous cancer (lgSC)) характеризуется относительно стабильным генетическим профилем и, как следствие, относительно благоприятным клиническим течением. Напротив, серозная аденокарцинома яичника высокой степени злокачественности (всСА, high-grade serous cancer (hgSC)) имеет агрессивное клиническое течение [1]. Применение секвенирования следующего поколения подтвердило существование генетической гетерогенности между этими подтипами, а также внутри каждого подтипа.

Анализ баз данных TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://portal.gdc.cancer.gov>), cBioPortal (cBioPortal for Cancer Genomics) и DisGeNET (<https://www.disgenet.org>), а также данных литературы [3] показал, что гетерогенность может касаться целого ряда генов: *BRCA1/2*, *CHEK2*, *ATM*, *RAD51D*, *TP53*, *PIK3CA*, *NOTCH*, *KRAS*, *AKT2*, *EGFR*, *BRAF* и др. При этом хорошо изучены соматические и герминальные мутации, в то время как данных по ко-

пийности генов представлено не так много, и они большей частью не валидированы [4].

Вариации в числе копий генов (Copy Number Variation (CNV)) — вид генетического полиморфизма, результатом которого является уменьшение или увеличение количества копий определенного гена, а следовательно, снижение или увеличение экспрессии продукта этого гена [5]. Показатель CNV можно рассматривать как высокоспецифичный и высокочувствительный биологический маркер, подходящий как для ранней диагностики, так и для молекулярного типирования опухолей. Также исследование вариации показателя копийности генетических локусов может раскрыть механизмы, лежащие в основе развития и прогрессирования серозной аденокарциномы яичников.

На современном этапе развития молекулярной онкологии разработка высокоэффективных и малоинвазивных подходов ранней диагностики невозможна без скрининга молекулярно-генетических маркеров во внеклеточной ДНК (внДНК) плазмы крови. В качестве таких маркеров большим потенциалом обладает показатель вариации числа копий генов (CNV) [5]. Внеклеточная ДНК (внДНК) в плазме крови, как правило, происходит из ядерной и митохондриальной ДНК соматических или опухолевых клеток, подвергшихся апоптозу/некрозу; ДНК клеток крови, вирусной и бактериальной ДНК [6].

В настоящее время для серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности не существует высоко-

специфичного и чувствительного скринингового теста, что препятствует их ранней диагностики [1].

Проведенный в наших предыдущих исследованиях анализ позволил сформировать список генетических локусов, показатель копийности которых обладает большим потенциалом для малоинвазивной диагностики серозной аденокарциномы яичников [7]. Поэтому целью данной работы стал лабораторный скрининг маркеров для дифференциальной малоинвазивной диагностики разных молекулярных подтипов серозной аденокарциномы яичника.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (Ростов-на-Дону) за период с 2018 по 2021 г. Проанализированы данные комплексного клинического и молекулярно-генетического обследования 100 больных серозной аденокарциномой яичника и 30 доноров (контроль) без онкологической патологии.

Определение показателя относительной копийности генов во внеклеточной ДНК плазмы крови. Для получения внеклеточной ДНК

(внДНК) использовали кровь, полученную в процессе венопункции у больных серозной аденокарциномой яичников высокой ($n = 50$) и низкой ($n = 50$) степени злокачественности, а также у 30 условно здоровых доноров.

Выделение внДНК осуществляли из плазмы фенол-хлороформным методом в модификации Д.С. Кутилина и соавторов [7]. Оценку показателя относительной копийности генов (перечень представлен в табл. 1) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). В качестве референсных локусов для нормализации полученных показателей амплификации использовали *GAPDH*, *ACTB* и *B2M*.

Амплификацию внДНК проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 в реакционной смеси, содержащей матрицу (внДНК ~ 0,5 нг), раствор dNTP, праймеры, раствор хлорида магния, ПЦР-буфер с интеркалирующим красителем EvaGreen и ДНК-полимеразу [6]. Программа амплификации была следующей: 95 °C 180 секунд, 40 циклов: 95 °C 10 секунд, 56 °C 30 секунд (чтение оптического сигнала по каналу FAM) и 72 °C 10 секунд. Относительную

Таблица 1

Список синтетических олигонуклеотидов для определения относительной копийности генов

№	Наименование гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
1	<i>GAPDH</i>	GCTGAACGGGAAGCTCACC	GCAGGTTTTTCTAGACGGCAT
2	<i>ACTB</i>	CACCCTGAAGTACCCCATTC	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAC
3	<i>B2M</i>	TGAGTGTGTCTCCATGTTTGT	ATTCTCTGCTCCCCACCTCC
4	<i>BAX</i>	GCCTCTCTCTACTTTGGG	AAACACAGTCCAAGGCAGC
5	<i>BCL2</i>	GAGTGGGATGCGGGAGATG	GGTGAAGGGCGTCAGGTG
6	<i>PTEN</i>	GTCCAGAGCCATTTCCATCCT	TGTCATGTCTGGGAGCCTGT
7	<i>TP53</i>	GGTCGGTGGGTTGGTAGTTT	GTGTGGGATGGGGTGAGATT
8	<i>MDM2</i>	TCTTTGGGACCCATCTACCCT	AGAATGCTTTAGTCCACCTAACCTT
9	<i>BRCA2</i>	TGCATCCCTGTGTAAGTGCAT	ACGTACTGGGTTTTTAGCAAGC
10	<i>CASP3</i>	ATGCAGCAAACCTCAGGGAA	TTCACCATGGCTCAGAAGCA
11	<i>CASP8</i>	TCTTTATGATATGGGGAAACAATG	GTTCTTGCTTCCTTTGCGGA
12	<i>SOX2</i>	TTTGTCTCGAGACGGAGAAGC	CCGGGCAGCGTACTTAT
13	<i>PIK3CA</i>	GCTTGGGAGGATGCCCAAT	GCTGTGAAATGCGTCTGGA
14	<i>CYP1B1</i>	TGCGACTCCAGTTGTGAGAG	GAGTCTTTGGCGTCGTACAG
15	<i>ESR1</i>	GGACTGCACTTGCTCCCGT	AGCACAGCCCCGAGGTTAGAG
16	<i>SULT1E1</i>	GAGGAGCTTGTGGACAGGATT	CCTTCTCATGAAGGGCGACAT

копийность (rCN) для образцов плазмы крови рассчитывали по формуле, описанной Д.С. Кутилиным [8].

Статистический и биоинформационный анализ данных выполняли в различных программах и средах программирования, включая Statistica 10.0 (StatSoft, США) и Rstudio (v4.0.1).

Для проверки распределения признаков на соответствие закону нормального распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для оценки различий значений количественных показателей применяли t-критерий Стьюдента (для нормального распределения) или непараметрический U-критерий Манна-Уитни (для распределения отклоняющегося от нормального). Для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони.

Для разделения генов по функциональным модулям использовали алгоритм FMD (Functional module detection), основанный на методе k-ближайших соседей (k-nearest neighbors algorithm, KNN) и методе определения множества Лувена для кластеризации тесно связанных генетических локусов в отдельные модули, которые подвергаются процедуре функционального обогащения. Результатом выполнения алгоритма является графическое представление сигнальных путей, в которых участвуют гены, по схожести объединенные в кластеры, а также результирующее значение Q. Значение Q каждого члена функционального модуля рассчитывается с использованием одностороннего точного критерия Фишера и поправки Бенджамини-Хохберга для корректировки множественного сравнения [9].

Идентификация общих сигнальных путей исследуемых генов проводилась с помощью

алгоритма «сетевой интеграции нескольких ассоциаций», который предсказывает функцию и положение гена в составе сложной сигнальной сети, содержащей множество других генов, а также рассчитывает W-value — особую математическую оценку каждой точки вычисленной сигнальной сети, отражающую силу связи между соседними точками [10].

LASSO-пенализованная логистическая регрессия. Для выбора минимального набора генов и создания предсказательных моделей использовали LASSO-пенализованную логистическую регрессию. Анализ выполняли в оболочке Rstudio (v4.0.1) на языке программирования R. Коэффициент регуляризации L1 определяли при помощи k-мерной кросс-валидации. Для предотвращения переобучения модели проводили оптимизацию коэффициента регуляризации при помощи генерации 2000 повторных выборок методом bootstrap. Данные были случайным образом разделены на обучающую и тестовую выборки. Эффективность модели, построенной на основе обучающей выборки, оценивали на данных тестовой выборки: вычисляли площадь под ROC-кривой и показатель Бриера. Важность переменной определяли путем подсчета доли bootstrap моделей с ненулевым коэффициентом этой переменной. Окончательную модель строили, используя оптимальное значение L1.

Результаты исследования и их обсуждение

На основании наших исследований, биоинформационного анализа баз данных и литературы был сформирован список генетических локусов, показатель копийности которых обладает

Таблица 2

Потенциальные маркеры для малоинвазивной диагностики серозной аденокарциномы яичников

hgSC		lgSC	
CNV повышено	CNV снижено	CNV повышено	CNV снижено
<i>MDM2</i>	<i>TP53</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>BAX</i>
<i>SOX2</i>	<i>BRCA2</i>	<i>PTEN</i>	<i>CASP3</i>
<i>ESR1</i>		<i>BCL2</i>	<i>CASP8</i>
<i>CYP11B1</i>			
<i>SULT1E1</i>			

большим потенциалом для малоинвазивной диагностики серозной аденокарциномы яичников (табл. 2).

На вДНК, выделенной из плазмы 50 больных серозной аденокарциномой яичников высокой степени злокачественности и 50 больных серозной аденокарциномой яичников низкой степени злокачественности, а также 30 условно здоровых доноров, проведена валидация потенциальных маркеров, представленных в табл. 2.

В ходе валидации обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение числа копий генов *SULT1-E1*, *CYP1-B1* и *ESR1* в 2,8; 3; и 5 раз соответственно во вДНК у 80, 75 и 85% соответственно обследованных больных серозной аденокарциномой яичников высокой степени злокачественности относительно вДНК плазмы крови условно-здоровых доноров (рис. 1).

У 15% обследованных больных серозной аденокарциномой яичников высокой степени злокачественности (возраст 40–45 лет) во вДНК наблюдалось снижение копийности *TP53* и *BRCA2* в 2,2 раза ($p < 0,05$) и 2,1 раза ($p < 0,05$) соответственно. Еще у 30% больных серозной аденокарциномой яичников высокой степени злокачественности (возраст 64–75 лет) наблюдалось повышение копийности генов *MDM2* и *SOX2* в 2 раза ($p < 0,05$) и 2 раза ($p < 0,05$) соответственно относительно условно-здоровых доноров.

Применение алгоритма «СИНА» («сетевой интеграции нескольких ассоциаций») позволи-

ло выявить наличие и силу взаимодействий между генетическими локусами *TP-53*, *MDM2*, *SOX2*, *CYP1-B1*, *ESR1*, *BRCA2* и *SULT1-E1*, а также локусами, ассоциированными с ними в общих сигнальных путях (рис. 2, табл. 3). Для локусов, перечисленных выше, наиболее сильное взаимодействие вычислено по следующим критериям: со-экспрессия (Gene Expression Omnibus), общие белковые домены (BioGRID, IntAct и MIPS), регуляция общими транскрипционными факторами (JASPAR), со-локализация наблюдалось с локусами *RPL-11*, *TFF-1*, *CUL-9*, *CUL-7*, *SFN* и *RAD-51*. Тогда можно предположить, что изменение числа копий генов *ESR1*, *CYP1-B1* и *SULT1-E1*, помимо экспрессии соответствующих генов, может отразиться и на транскрипционной активности генов *TFF-1*, *PAK-1*, *PSMD-1*, *CYP1-B1*, *TIMP-4*, *WISP-2*, *SERPIN-B9*, *MDM2* (для *ESR1*), *ESR1* (для *CYP1-B1*), *TP-53* (для *SULT1-E1*) (рис. 2, табл. 3).

Гиперэстрогения (эндогенная или экзогенная) играет важную роль в патогенезе целого ряда гинекологических злокачественных опухолей, в том числе и серозных аденокарцином яичника высокой степени злокачественности [11]. Эстрогены образуются из андрогенов под действием НАДФН-зависимого фермента ароматазы, кодируемого геном *CYP19* [11]. В предыдущем разделе было установлено, что число копий гена *CYP19* в опухолевых клетках яичника статистически значимо не отличается от этого показателя в нормальных клетках. Это может

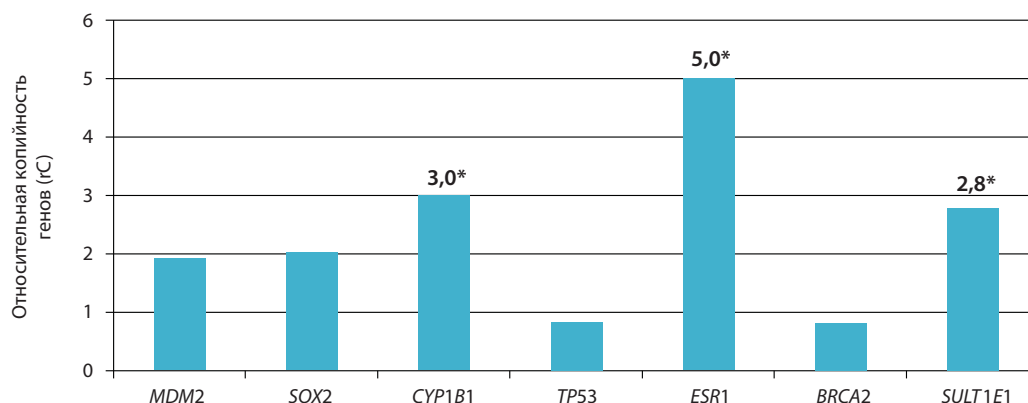


Рис. 1. Показатель относительного количества копий генетических локусов во вДНК больных серозной аденокарциномой яичников высокой степени злокачественности.

* — статистически значимые изменения относительно количества копий генетических локусов во вДНК плазмы крови условно здоровых доноров ($p < 0,005$).

Уровень межгенного взаимодействия, вычисленный с помощью алгоритма «СИНА»

Локус 1	Локус 2	W-value	Тип взаимодействия
<i>RPL-11</i>	<i>MDM2</i>	0.70558820	Предсказанные взаимодействия
<i>TFF-1</i>	<i>ESR1</i>	0.63245550	Генетические взаимодействия
<i>PAK-1</i>	<i>ESR1</i>	0.59970117	Предсказанные взаимодействия
<i>RAD-51</i>	<i>BRCA2</i>	0.57735026	Предсказанные взаимодействия
<i>CUL9</i>	<i>TP53</i>	0.54499210	Физические взаимодействия
<i>WWOX</i>	<i>TP53</i>	0.51897030	Предсказанные взаимодействия
<i>CCNG1</i>	<i>MDM2</i>	0.48089832	Предсказанные взаимодействия
<i>PSMD1</i>	<i>ESR1</i>	0.39220178	Предсказанные взаимодействия
<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	0.35735673	Предсказанные взаимодействия
<i>DAXX</i>	<i>MDM2</i>	0.34891528	Предсказанные взаимодействия
<i>SFN</i>	<i>TP53</i>	0.30858160	Предсказанные взаимодействия
<i>CUL7</i>	<i>TP53</i>	0.30382136	Физические взаимодействия
<i>RPL5</i>	<i>MDM2</i>	0.29350963	Предсказанные взаимодействия
<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	0.27131596	Физические взаимодействия
<i>OBSL1</i>	<i>TP53</i>	0.27131596	Физические взаимодействия
<i>NPAS3</i>	<i>TP53</i>	0.27131596	Физические взаимодействия
<i>DAXX</i>	<i>TP53</i>	0.23516133	Предсказанные взаимодействия
<i>CCNG1</i>	<i>MDM2</i>	0.22151214	Общие сигнальные пути
<i>RAD51</i>	<i>BRCA2</i>	0.21969065	Общие сигнальные пути
<i>ESR1</i>	<i>CYP11B1</i>	0.19609936	Общие сигнальные пути
<i>TIMP4</i>	<i>ESR1</i>	0.19609936	Общие сигнальные пути
<i>WISP2</i>	<i>ESR1</i>	0.19609936	Общие сигнальные пути
<i>SERPINB9</i>	<i>ESR1</i>	0.19609936	Общие сигнальные пути
<i>CCNG1</i>	<i>TP53</i>	0.16988112	Предсказанные взаимодействия
<i>MDM4</i>	<i>MDM2</i>	0.15952477	Физические взаимодействия
<i>ESR1</i>	<i>MDM2</i>	0.13227198	Предсказанные взаимодействия
<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	0.10426662	Физические взаимодействия
<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	0.10153924	Предсказанные взаимодействия
<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	0.09228970	Физические взаимодействия
<i>CUL9</i>	<i>TP53</i>	0.09228970	Физические взаимодействия
<i>RAD51</i>	<i>BRCA2</i>	0.09015864	Физические взаимодействия
<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	0.06781394	Совместная локализация
<i>DAXX</i>	<i>TP53</i>	0.05460464	Совместная локализация
<i>TP53</i>	<i>SULT1E1</i>	0.05290603	Физические взаимодействия

свидетельствовать о том, что особые изменения в процессе образования эстрогенов в опухолевых клетках по сравнению с нормальными у больных серозной аденокарциномой яичников отсутствуют.

Стероидные женские половые гормоны осуществляют свое действие через соответствующие рецепторы, имеющиеся в разных тканях. В настоящее время известно два вида эстрогеновых рецепторов — б и в, функции которых

интенсивно изучаются [12]. Так, в исследованиях А. Bardin и коллег, и О.И. Кита с соавторами показано, что сверхэкспрессия генетического локуса *ESR1* наблюдается при онкотрансформации [13], в то время как *ESR2* регулирует митотическую активность и защищает от аномальной пролиферации, индуцированной активацией эстрогеновых рецепторов б [11].

По данным О.И. Кита и соавторов [14], ключевым фактором в канцерогенезе ряда опухолей может быть метаболическая активация эстрадиола. Локусы *CYP1-A1/-B1* кодируют ферменты из семейства цитохромов P450, катализирующие гидроксилирование эстрадиола в положениях C2 и C4 соответственно. 4-ОН-эстрогены (метаболиты CYP1B1) играют важную роль в злокачественной трансформации. При этом во многих гинекологических опухолях значительно увеличена транскрипционная активность генетических локусов, регулирующих гидроксилирование эстрадиола (*CYP1-A1/-B1*) и уровень ядерных рецепторов эстрогенов (*ESR1*, *SULT1-E1* — ген сульфотрансферазы) [14].

Поэтому отличия в показателе копийности описанных выше генетических локусов во внеклеточной ДНК больных серозной аденокарциномой яичника высокой степени злокачественности относительно условно здоровых доноров хорошо вписываются в теорию эстроген-ассоциированного канцерогенеза [11], согласно которой сверхэкспрессия *CYP1-B1* (и соответственно активность фермента) в сочетании с повышенным числом ядерных рецепторов ERб (из-за aberrантной копийности и экспрессии гена *ESR1*) приводит к метаболической активации эстрадиола [11] и усилению пролиферации в тканях-мишенях.

Этот процесс может быть ингибирован увеличением активности фермента сульфотрансферазы (ассоциировано с повышением транскрипции гена *SULT1-E1*), участвующей в инактивации эстрогенов путем их сульфатирования [11]. Но следует учитывать, что обнаруженное в ходе данного исследования увеличение копийности гена *SULT1-E1* не позволяет однозначно говорить о биологическом значении

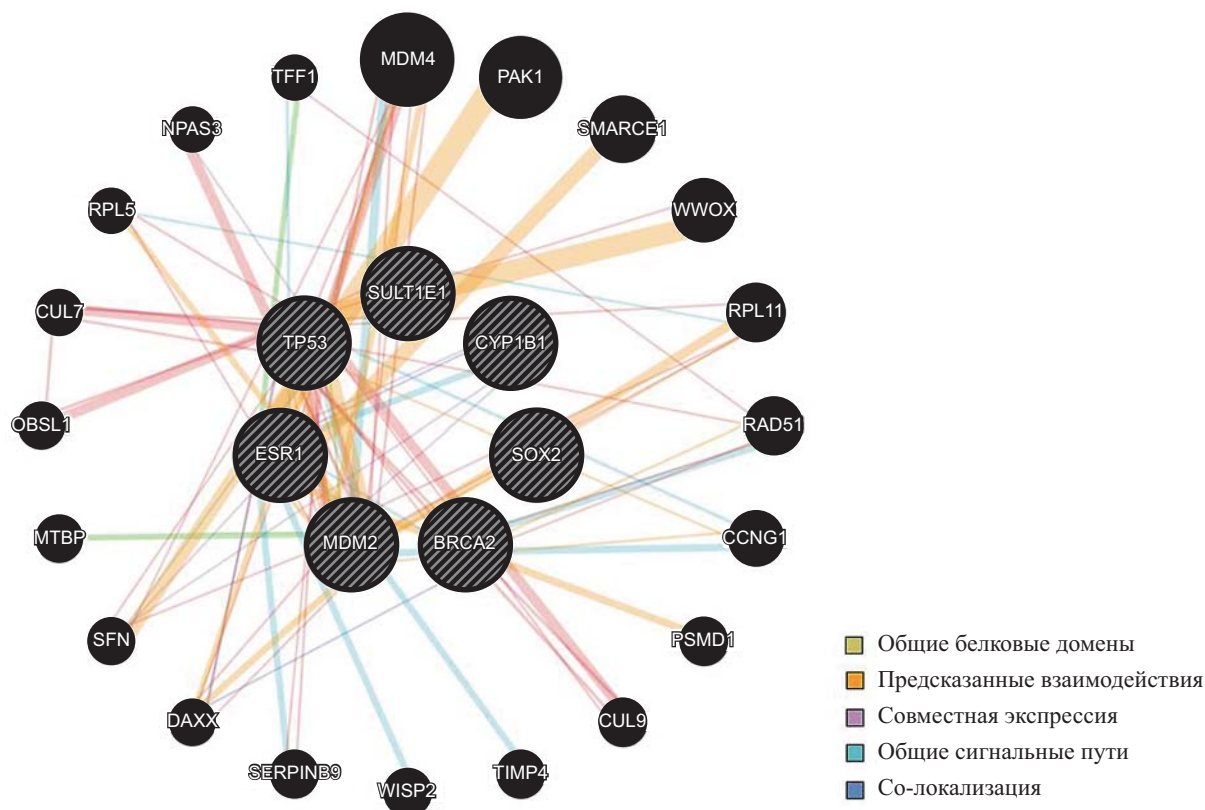


Рис. 2. Сеть функциональных межгенных взаимодействий между локусами, регулирующими метаболизм/рецепцию эстрогенов, и локусами, регулирующими репарацию ДНК, пролиферацию и апоптоз

данного явления — об изменении транскрипционной активности соответствующего гена или фермента. Тем не менее показатель копийности *SULT1-E1* можно рассматривать как молекулярно-генетический маркер серозной аденокарциномы яичника высокой степени злокачественности.

Также обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генетических локусов *PTEN* и *BCL2* в 1,9 и 4,1 раза соответственно во внеклеточной ДНК плазмы крови у больных серозной аденокарциномой яичников низкой степени злокачественности относительно внеклеточной ДНК плазмы крови условно здоровых доноров. При этом наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) снижение числа копий генов *BAX* и *CASP-3* в 3,3 и 2,5 раза во внеклеточной ДНК плазмы крови у 75 и 80% соответственно обследованных больных серозной аденокарциномой яичников низкой степени злокачественности относительно внеклеточной ДНК плазмы крови условно-здоровых доноров (рис. 3).

Отметим, что приблизительно у 20% больных копийность *PIK3CA* во внеклеточной ДНК была увеличена в 1,85 раза ($p < 0,05$) относительно условно здоровых доноров.

Применение алгоритма «СИНА» («сетевой интеграции нескольких ассоциаций») позволило оценить силу взаимодействия между генами *PIK3CA*, *PTEN*, *BCL2*, *BAX*, *CASP-3* и *CASP-8*, а также генетическими локусами, связанными с ними в общих сигнальных путях (рис. 4.4,

табл. 4.3). Для локусов *PTEN*, *PIK3CA*, *BCL2*, *BAX*, *CASP-3* и *CASP-8* самая сильная взаимосвязь выявлена с генами *SEPT-7*, *ITLN-1*, *FADD*, *MCL-1*, *FAS*, *VDAC1* и *GAS-2* (определено по критериям, описанным выше, в том числе — соэкспрессия, общность белковых доменов, общая транскрипционная регуляция, со-локализация). Соответственно, изменение числа копий генов *PTEN*, *BCL2*, *BAX* и *CASP-3* может отразиться и на транскрипционной активности других генов, например: *PIK3CA*, *CASP3*, *BAX*, *CASP3*, *BAX*, *CASP3*, *BAX* (для *BCL2*), *SEPT7*, *PIK3R3*, *MCL1*, *FAS*, *BCL2*, *VDAC1*, *CASP8*, *CASP9* и *BIK* (для *BAX*), *PIK3CA*, *BAX*, *BCL2*, *FADD*, *LPAR3*, *GAS2*, *CASP8*, *MCL1* и *CASP9* (для *CASP3*) и *PIK3CA*, *MCL1*, *MAST2*, *DLG1* и *CASP8* (для *PTEN*) (рис. 4, табл. 4).

Как уже упоминалось в предыдущей главе, генетический локус *PTEN* кодирует фосфатазу, катализирующую отщепление фосфатной группы в положении 3D-инозитольного кольца фосфатидилинозитол-3-фосфатов и тем самым лишаящую их функции вторичных медиаторов в клеточных сигнальных путях. К тому же *PTEN* является антионкогеном и блокирует передачу сигнала по PI3K/АКТ/mTOR-сигнальному пути [15].

BCL2 кодирует регуляторный белок из семейства Bcl, которые ингибируют клеточную гибель (апоптоз) двумя путями — изменяя проницаемость митохондриальной мембраны (это предотвращает выход цитохрома С из митохондрий и ингибирует каспазы) и связываясь

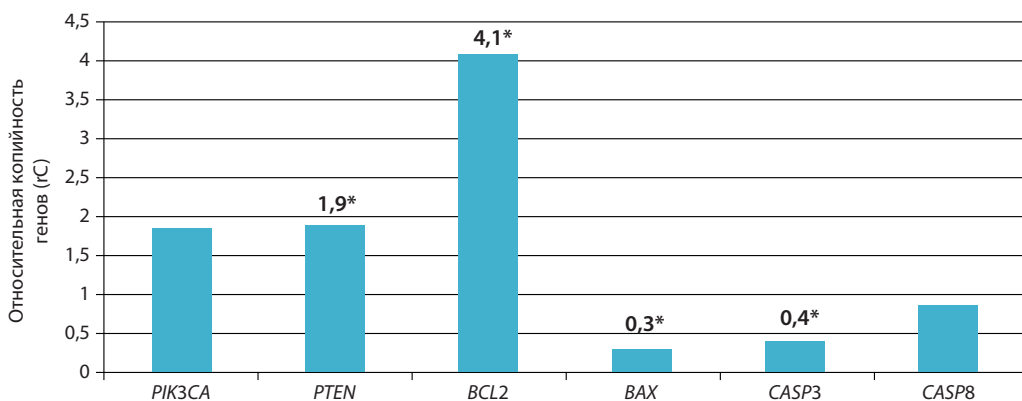


Рис. 3. Отличия в количестве копий генов во вДНК плазмы крови у больных серозной аденокарциномой яичников низкой степени злокачественности от этого показателя условноздоровых доноров.

* — статистически значимые отличия ($p < 0,05$).

Уровень межгенного взаимодействия, вычисленный с помощью алгоритма «СИНА»

Ген 1	Ген 2	W-value	Тип взаимодействия
<i>FADD</i>	<i>CASP-8</i>	0.76537	Предсказанные взаимодействия
<i>MAST2</i>	<i>PTEN</i>	0.70711	Физические взаимодействия
<i>FAS</i>	<i>CASP8</i>	0.70711	Физические взаимодействия
<i>FAS</i>	<i>FADD</i>	0.70711	Физические взаимодействия
<i>DLG1</i>	<i>PTEN</i>	0.70711	Физические взаимодействия
<i>CEBPB</i>	<i>CASP8</i>	0.70711	Предсказанные взаимодействия
<i>BMF</i>	<i>MCL1</i>	0.69382	Предсказанные взаимодействия
<i>BCL2</i>	<i>BAX</i>	0.66162	Предсказанные взаимодействия
<i>BCL2</i>	<i>BAX</i>	0.60940	Предсказанные взаимодействия
<i>SEPT7</i>	<i>BAX</i>	0.55051	Генетические взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BIK</i>	0.48803	Предсказанные взаимодействия
<i>VDAC1</i>	<i>BAX</i>	0.47752	Физические взаимодействия
<i>ITLN1</i>	<i>BCL2</i>	0.47567	Генетические взаимодействия
<i>RAD9A</i>	<i>BCL2</i>	0.42265	Физические взаимодействия
<i>CEBPB</i>	<i>CASP8</i>	0.41421	Предсказанные взаимодействия
<i>BIK</i>	<i>BCL2</i>	0.40728	Предсказанные взаимодействия
<i>BCL2</i>	<i>BAX</i>	0.38708	Физические взаимодействия
<i>TMBIM6</i>	<i>BCL2</i>	0.38708	Физические взаимодействия
<i>BCL2L1</i>	<i>BIK</i>	0.38022	Предсказанные взаимодействия
<i>VDAC1</i>	<i>BCL2L1</i>	0.36094	Физические взаимодействия
<i>BCL2L11</i>	<i>BCL2</i>	0.35920	Предсказанные взаимодействия
<i>LPAR3</i>	<i>CASP3</i>	0.35463	Общие сигнальные пути
<i>GAS2</i>	<i>CASP3</i>	0.35463	Общие сигнальные пути
<i>BIK</i>	<i>BCL2</i>	0.33189	Физические взаимодействия
<i>RAD9A</i>	<i>BCL2L1</i>	0.31003	Физические взаимодействия
<i>BCL2L1</i>	<i>CASP8</i>	0.29864	Генетические взаимодействия
<i>CASP9</i>	<i>CASP8</i>	0.29864	Генетические взаимодействия
<i>BMF</i>	<i>BCL2</i>	0.26503	Предсказанные взаимодействия
<i>VDAC1</i>	<i>BCL2</i>	0.24931	Физические взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BAX</i>	0.24828	Предсказанные взаимодействия
<i>BMF</i>	<i>BCL2L1</i>	0.24742	Предсказанные взаимодействия
<i>CASP8</i>	<i>BCL2</i>	0.19966	Генетические взаимодействия
<i>BCL2L11</i>	<i>BAX</i>	0.19269	Физические взаимодействия
<i>BCL2L10</i>	<i>BAX</i>	0.14744	Физические взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BCL2L11</i>	0.14634	Предсказанные взаимодействия
<i>BCL2L1</i>	<i>BCL2</i>	0.14369	Общие белковые домены
<i>BCL2L10</i>	<i>BAX</i>	0.12486	Физические взаимодействия
<i>FADD</i>	<i>CASP8</i>	0.11236	Физические взаимодействия
<i>FAS</i>	<i>FADD</i>	0.10352	Физические взаимодействия

Опухоли придатков матки

Ген 1	Ген 2	W-value	Тип взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BAX</i>	0.10310	Общие белковые домены
<i>BCL2L10</i>	<i>MCL1</i>	0.09844	Общие белковые домены
<i>BCL2L10</i>	<i>BAX</i>	0.09844	Общие белковые домены
<i>BCL2L11</i>	<i>CASP3</i>	0.09656	Общие сигнальные пути
<i>FAS</i>	<i>CASP8</i>	0.09493	Физические взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BCL2</i>	0.09108	Общие белковые домены
<i>BCL2L1</i>	<i>MCL1</i>	0.09108	Общие белковые домены
<i>BCL2</i>	<i>BAX</i>	0.09108	Общие белковые домены
<i>BCL2L1</i>	<i>BAX</i>	0.09108	Общие белковые домены
<i>TMBIM6</i>	<i>BCL2</i>	0.09024	Физические взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BCL2</i>	0.08973	Физические взаимодействия
<i>BCL2L10</i>	<i>BCL2</i>	0.08697	Общие белковые домены
<i>BCL2L10</i>	<i>BCL2L1</i>	0.08697	Общие белковые домены
<i>BCL2L10</i>	<i>BCL2</i>	0.08027	Физические взаимодействия
<i>CASP8</i>	<i>CASP3</i>	0.07905	Общие белковые домены
<i>MCL1</i>	<i>BAX</i>	0.07630	Физические взаимодействия
<i>BIK</i>	<i>BAX</i>	0.07350	Общие белковые домены
<i>MCL1</i>	<i>BIK</i>	0.07350	Общие белковые домены
<i>MCL1</i>	<i>BIK</i>	0.07212	Физические взаимодействия
<i>BCL2L1</i>	<i>BAX</i>	0.06950	Физические взаимодействия
<i>CASP9</i>	<i>CASP3</i>	0.06901	Общие белковые домены
<i>FAS</i>	<i>CASP8</i>	0.06610	Общие сигнальные пути
<i>BIK</i>	<i>BCL2</i>	0.06493	Общие белковые домены
<i>BCL2L1</i>	<i>BIK</i>	0.06493	Общие белковые домены
<i>BCL2L10</i>	<i>BCL2</i>	0.06321	Физические взаимодействия
<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	0.06178	Общие сигнальные пути
<i>CASP9</i>	<i>CASP3</i>	0.05994	Физические взаимодействия
<i>BMF</i>	<i>MCL1</i>	0.05874	Физические взаимодействия
<i>MCL1</i>	<i>BIK</i>	0.05727	Физические взаимодействия
<i>TMBIM6</i>	<i>BCL2</i>	0.05359	Физические взаимодействия
<i>CASP9</i>	<i>CASP8</i>	0.05351	Общие белковые домены
<i>CASP8</i>	<i>CASP3</i>	0.05274	Физические взаимодействия
<i>BCL2</i>	<i>BAX</i>	0.04800	Физические взаимодействия
<i>BCL2L1</i>	<i>BIK</i>	0.04653	Физические взаимодействия
<i>BAX</i>	<i>CASP3</i>	0.04629	Общие сигнальные пути
<i>BMF</i>	<i>MCL1</i>	0.04543	Физические взаимодействия
<i>BCL2</i>	<i>CASP3</i>	0.04440	Общие сигнальные пути
<i>DLG1</i>	<i>PIK3CA</i>	0.03921	Общие сигнальные пути
<i>BCL2L1</i>	<i>PIK3CA</i>	0.03903	Общие сигнальные пути
<i>BMF</i>	<i>BCL2L1</i>	0.03790	Физические взаимодействия

с *APAF1* (фактор ассоциированный с апоптозом) [7]. Чрезмерная экспрессия антиапоптотических генов и недостаточная экспрессия проапоптотических генов могут привести к отсутствию гибели клеток, характерной для рака. Гиперэкспрессия *BCL2*, ассоциированная с его повышенной копийностью, встречается при многих видах рака.

Ген *BAX* (*Bcl-2-associated X protein*) кодирует белок, который взаимодействует с митохондриальным потенциал-зависимым анионным каналом и увеличивает его открытие, что приводит к потере мембранного потенциала и высвобождению цитохрома С. Кроме того, активированный *BAX* и *Bak* образуют олигомерные поры в наружной мембране митохондрий, что приводит к активации каспаз и реализации программы апоптоза [16].

Ген *CASP-3* кодирует протеолитический фермент, одну из эффекторных каспаз человека, взаимодействующую с каспазой-8 и каспазой-9. Пошаговая инициация каспазного каскада выполняет ведущую роль в клеточном апоптозе. Каспаза-3 активируется в апоптотической клетке как внешним, так и внутренним (митохондриальным) путями [17]. Отличительной чертой про-каспазы 3 является необходимость постоянной регуляции, потому что иначе активность каспазы приводит к тотальной гибели всех клеток (как здоровых, так и патологических). Внешняя активация каспазы-3 далее иницирует каспазный каскад, характерный для сигнального пути апоптоза, в котором данный белок играет доминирующую роль [18].

Соответственно, сниженная копийность про-апоптотических генов (*BAX*, *CASP3*) и повы-

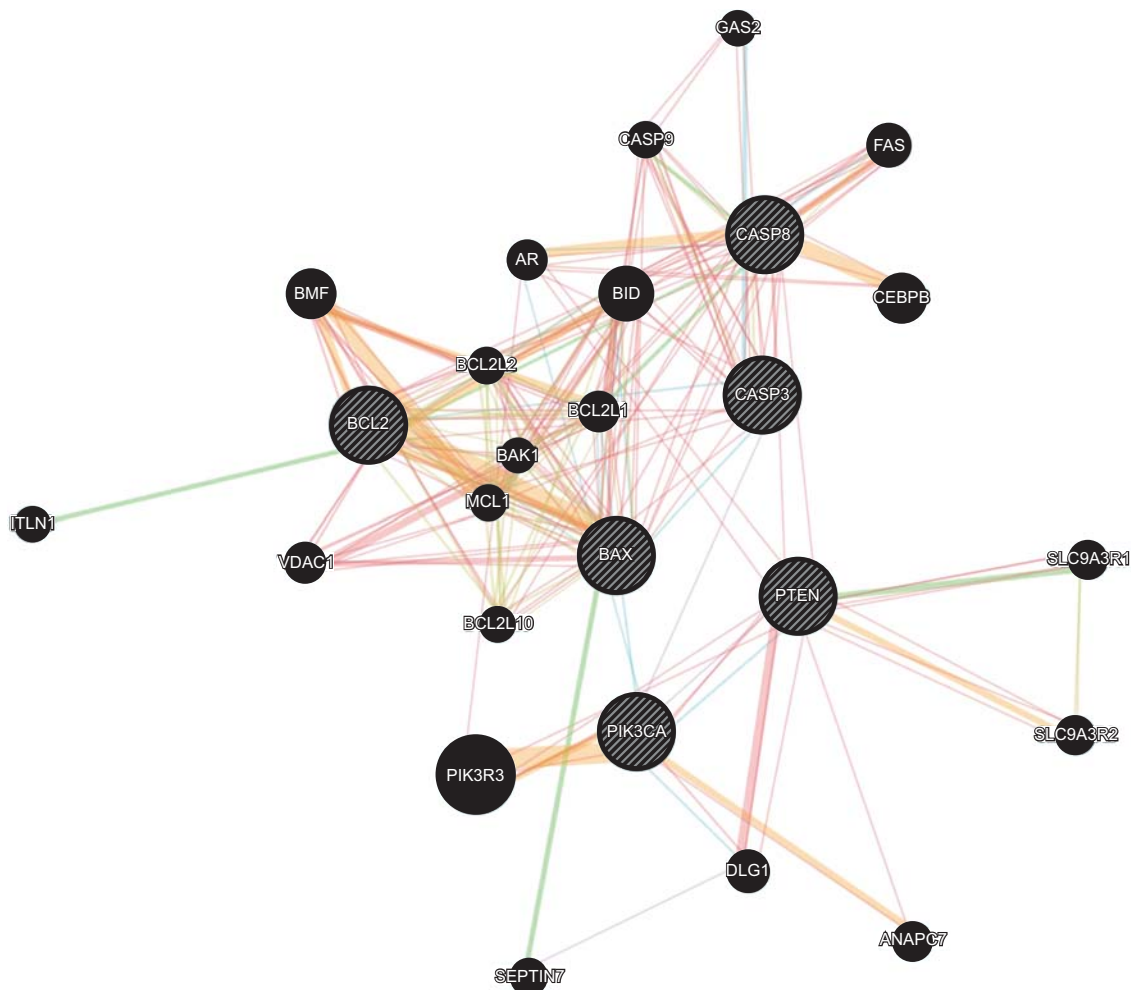


Рис. 4. Сеть функциональных взаимосвязей между генами, регулирующими пролиферацию и апоптоз у больных серозной аденокарциномой яичников низкой степени злокачественности (обозначения соответствуют указанным на рис. 2)

шенная копийность анти-апоптозного гена *BCL2* обеспечивают аномально высокую (по сравнению с нормальными клетками) пролиферативную активность клеток серозной аденокарциномы низкой степени злокачественности, при этом противоположный эффект оказывает повышенная копийность гена анти-онко-белка *PTEN*, что в совокупности обеспечивает лучшую выживаемость пациентов данной группы.

Таким образом, в плазме крови больных серозной аденокарциномой яичников обнаружен профиль копийности генов *CYP1B1*, *ESR1*, *SULT1E1*, *PTEN*, *BCL2*, *BAX* и *CASP3*, дифференциальный для двух групп больных серозной аденокарциномой: высокой и низкой степени злокачественности (табл. 5).

Основываясь на полученных результатах (табл. 5), далее формирование диагностической панели генов маркеров hgSC и lgSC производили на основе 49-ти пар генов, копийность которых значимо и стабильно отличалась между больными раком и условно здоровыми донорами.

Вначале для оценки диагностической значимости выбранных генов был проведен анализ их способности классифицировать доноров на группу больных раком или здоровых при помощи ROC-кривых. ROC-кривые со значением площади под кривой (AUC) не менее 0,70 представлены на рис. 5.

Для пары генетических локусов *ESR1/BCL2* значение AUC было равно 0,80, для *PTEN/BCL2* — 0,76; *BAX/CASP3* — 0,76; *BAX/*

BCL2 — 0,70; *PTEN/BAX* — 0,72 и *CYP1B1/ESR1* — 0,73 (рис. 5).

Как видно из представленных на рис. 5 данных, ни одна из пар маркеров не позволяла полностью разделить группы доноров. Поэтому была предложена панель генов, при помощи которой достигалась максимальная точность классификации.

Для получения надежной диагностической панели генов применили математический подход, основанный на LASSO-пенализованной логистической регрессии и оптимизированный при помощи множественных перевыборочных (bootstrap) наборов данных (рис. 6).

Регрессионные модели формировали из 14-ти пар генов с наиболее высоким значением AUC. Выбранные модели позволили правильно классифицировать образцы с точностью среднего значения AUC = 0,93 (95% CI 0,9305–0,9320).

Высокая важность переменных (рис. 6 (Б)) указывает на устойчивость классификатора к изменению состава выборки и на успешность методов отбора пар генов на предшествовавших этапах.

На основании bootstrap-моделей получена финальная панель генов:

PTEN/SULT1E1;
ESR1/BCL2;
PTEN/BCL2
BAX/BCL2;
ESR1/BAX;
PTEN/BAX;
CYP1B1/ESR1.

Таблица 5

Профиль копийности генов в плазме крови больных серозной аденокарциномой яичников

Ген	hgSC (n = 50)	lgSC (n = 50)
<i>CYP1B1</i>	↑	N
<i>ESR1</i>	↑	N
<i>SULT1E1</i>	↑	N
<i>PTEN</i>	N	↑
<i>BCL2</i>	N	↑
<i>BAX</i>	N	↓
<i>CASP3</i>	N	↓

N — не отличается от группы условно-здоровых доноров (n = 30).

↑ — статистически значимо выше (p < 0,05), чем в группе условно-здоровых доноров. (n = 30).

↓ — статистически значимо ниже (p < 0,05), чем в группе условно-здоровых доноров (n = 30).

Такое сочетание генов обеспечивает диагностическую чувствительность на уровне 95%, а специфичность — на уровне 90% (AUC 0.98) при разделении доноров на группу онкологических больных и здоровых (рис. 6). Однако информативность такой панели гораздо шире, чем выявление серозной аденокарциномы яичника. Из вошедших в панель генов пары *PTEN/BCL2*, *BAX/BCL2*, *PTEN/BAX* и *PTEN/*

BCL2 связаны с опухолями низкой степени злокачественности, а *CYP1B1/ESR1* — с опухолями высокой степени злокачественности. При этом важно отметить, что применение панели, состоящей из *PTEN*, *SULT1E1*, *ESR1*, *BAX*, *BCL2* и *CYP1B1*, позволяет выявлять больных серозной аденокарциномой яичника двух групп: низкой и высокой степени злокачественности (AUC = 0,96).

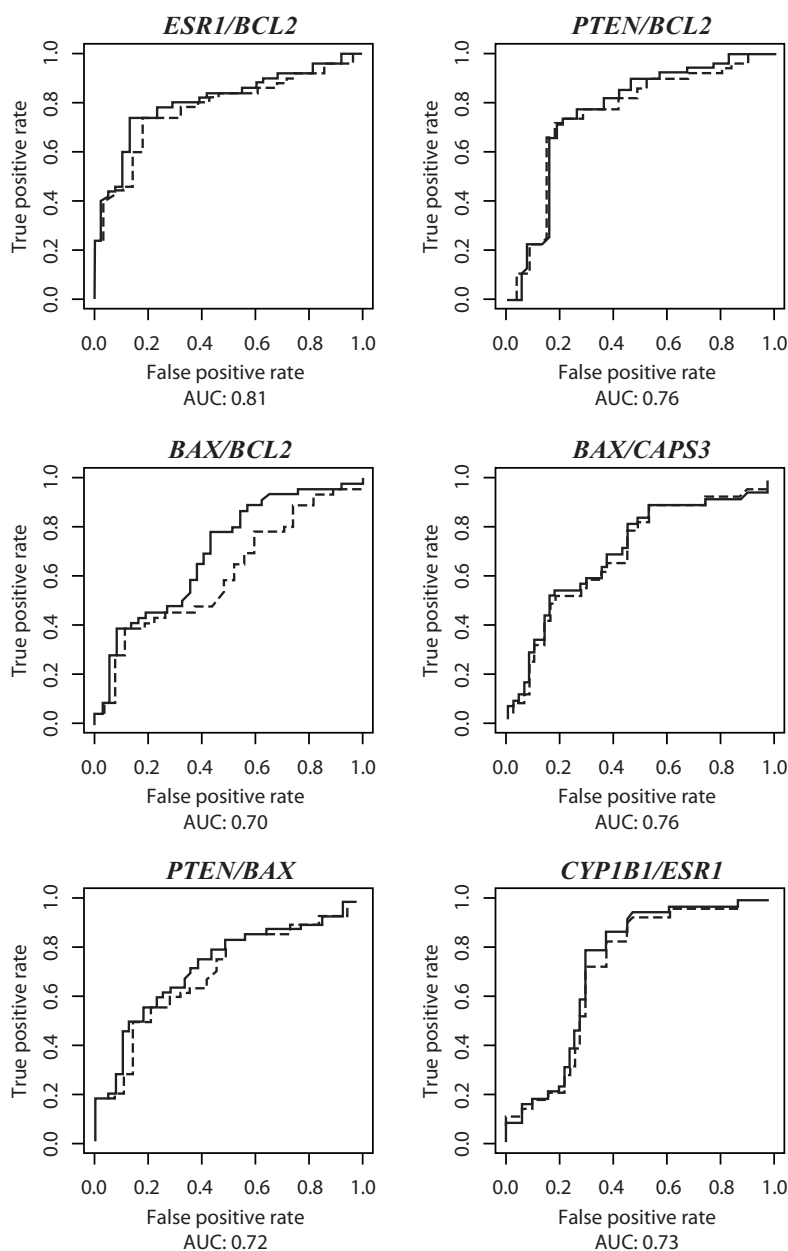


Рис. 5. ROC-кривые классификации групп больных серозной аденокарциномой яичника высокой степени злокачественности и условно здоровых доноров (сплошная линия) или больных серозной аденокарциномой яичника низкой степени злокачественности и условно здоровых доноров (прерывистая линия) на основании показателя копийности генетических локусов. Представлены только ROC-кривые со значением AUC > 0,70

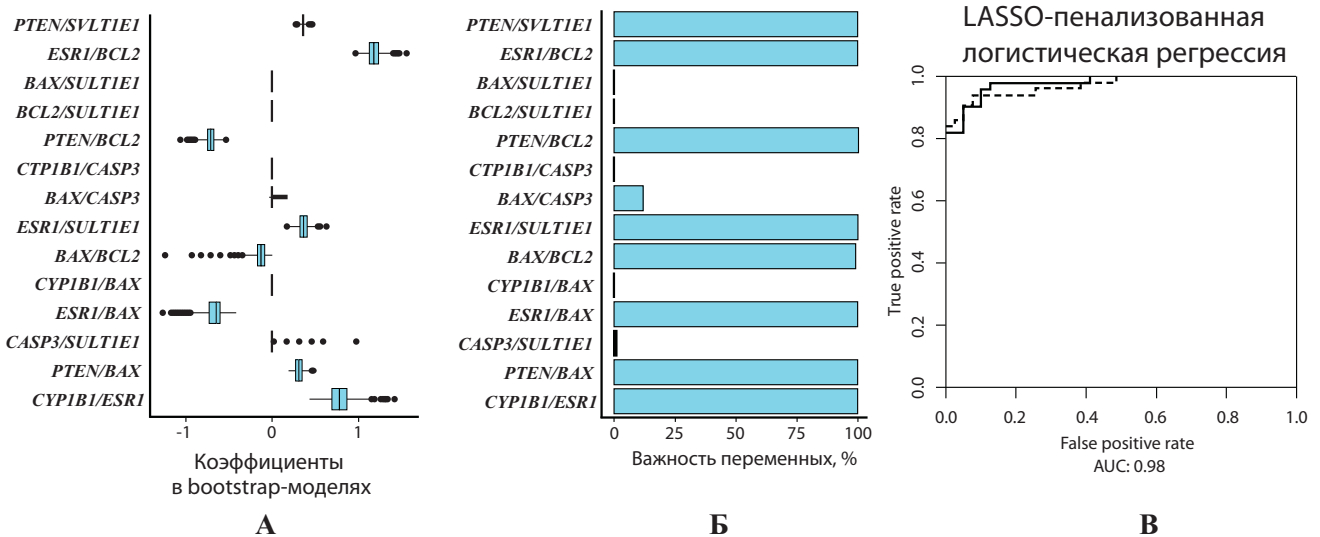


Рис. 6. LASSO-пенализованная модель для логистической регрессии уровня относительной копииности генетических локусов во вцДНК плазмы крови.

(А) Распределение регрессионных коэффициентов в bootstrap наборах данных; (Б) Важность переменных в bootstrap-моделях; (В) ROC-кривые для классификации образцов при помощи оптимизированной модели (непрерывная линия) и неоптимизированной модели (пунктирная линия)

Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило выделить на молекулярно-генетическом уровне подтипы серозной аденокарциномы яичников низкой и высокой степени злокачественности. Полученные результаты открывают большие перспективы для персонализирован-

ного подхода к лечению этих опухолей. Одновременное определение показателей копииности генов *PTEN*, *SULT1E1*, *ESR1*, *BAX*, *BCL2* и *CYP1B1* во внеклеточной ДНК плазмы крови позволяет выявлять больных серозной аденокарциномой яичника двух групп: низкой и высокой степени злокачественности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кутилин Д.С. Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения. Современные проблемы науки и образования. 2020; № 1; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29428>.
2. Blagden S.P. Harnessing Pandemonium: The clinical implications of tumor heterogeneity in ovarian cancer // Front. Oncol. 2015. Vol. 5. P. 149.
3. Kurman R.J., Shih I.M. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: Revisited, revised, and expanded // Am. J. Pathol. 2016. Vol. 186. P. 733–747.
4. Beltrame L., di Marino M., Fruscio R., Calura E., Chapman B., Clivio L., Sina F., Mele C., Iatropoulos P., Grassi T. Profiling cancer gene mutations in longitudinal epithelial ovarian cancer biopsies by targeted next-generation sequencing: A retrospective study // Ann. Oncol. 2015. Vol. 26. P. 1363–1371.
5. Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Карнаухов Н.С., Кит О.И. Изменение копииности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой легкого. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019; Т. 167(6). С. 731–738.
6. Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Чубарян А.В., Туркин И.Н., Водолажский Д.И., Николаева Н.В., Лысенко И.Б. Изменение относительной копииности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2017; № 3–2 (195–2). С. 74–82.
7. Кутилин Д.С., Цандекова М.Р., Порханова Н.В. Особенности копииности генов в опухолевых клетках у больных серозной аденокарциномой яичника. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020; Т. 170(9). С. 325–333.
8. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком. Молекулярная биология. 2020; Т. 54. № 4. С. 580–595.

9. Krishnan A., Zhang R., Yao V., Theesfeld C.L., Wong A.K., Tadych A., Volfovsky N., Packer A., Lash A., Troyanskaya O.G. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder // *Nature Neuroscience*. 2016. 19(11). P. 1454–1462.
10. Димитриади Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести. *Успехи молекулярной онкологии*. 2020; 7(2). С. 30–44.
11. Кут О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Моисеенко Т.И., Никитин И.С., Франциянц Е.М. Изменение экспрессии эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016; № 2 (157). С. 84–90.
12. Burke W.M., Orr J., Leitao M., Salom E., Gehrig P., Olawaiye A.B., Brewer M., Boruta D., Villella J., Herzog T. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part I. SGO Clinical Practice Endometrial Cancer Working Group. *Gynecologic Oncology*. 2014. V. 134. P. 385–392.
13. Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F. Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression // *Endocrine-Related Cancer*. 2004. Vol. 11. P. 537–551.
14. Кут О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Моисеенко Т.И., Никитин И.С., Франциянц Е.М. Способ прогнозирования рецидивов рака тела матки на основании уровня экспрессии генов PTEN и CYP1B1. Патент на изобретение RU 2605302 C1, 20.12.2016. Заявка № 2015148301/10 от 10.11.2015.
15. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Montalto G., Cervello M., Nicoletti F., Fagone P., Malaponte G., Mazzarino M.C., Candido S., Libra M., Bäsecke J., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Milella M., Tafuri A., Cocco L., Evangelisti C., Chiarini F., Martelli A.M. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response // *Oncotarget*. 2012. T. 3(9). P. 954–987.
16. McArthur K., Whitehead L.W., Heddleston J.M., Li L., Padman B.S., Oorschot V., Geoghegan N.D., Chappaz S., Davidson S., San C.H., Lane R.M., Dramicanin M., Saunders T.L., Sugiana C., Lessene R., Osellame L.D., Chew T.-L., Dewson G., Lazarou M., Ramm G., Lessene G., Ryan M.T., Rogers K.L., van Delft M.F., Kile B.T. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis // *Science*. 2018. 359 (6378): eaao6047.
17. Ghavami S., Hashemi M., Ande S.R., Yeganeh B., Xiao W., Eshraghi M., Bus C.J., Kadkhoda K., Wiehac E., Halayko A.J., Los M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes // *Journal of Medical Genetics*. 2009. Vol. 46, no. 8. P. 497–510.
18. Boatright K.M., Salvesen G.S. Mechanisms of caspase activation // *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier. 2003. Vol. 15, no. 6. P. 725–731.

АВТОРЫ

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

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

Порханова Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, доцент кафедры онкологии ФГБОУ ВО КубГМУ, e-mail: Porhanova.nat@mail.ru

Porkhanova Natalya V., Doctor of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Oncology, KubSMU, e-mail: Porhanova.nat@mail.ru

Кут Олег Иванович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, генеральный директор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ORCID 0000-0003-3061-6108, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Kit Oleg I., MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, General Director, National Medical Research Centre for Oncology, Ministry of Health of Russia, ORCID 0000-0003-3061-6108, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

Кутилин Денис Сергеевич, кандидат биологических наук, в.н.с. лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ORCID 0000-0002-8942-3733, e-mail: k.denees@yandex.ru

Kutilin Denis S., Ph.D., Leading Researcher Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre for Oncology, ORCID 0000-0002-8942-3733, e-mail: k.denees@yandex.ru