

На правах рукописи

КУДРЯВЦЕВА АННА ВИКТОРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
ОБМЕНА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация в виде научного доклада
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Лаборатории постгеномных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Научный консультант: **Макаров Александр Александрович**,
доктор биологических наук, профессор, академик
Российской академии наук, научный руководитель
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Равин Николай Викторович**
Доктор биологических наук, профессор, заместитель
директора по научной работе, Федеральное
государственное учреждение «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»»

Гуляева Людмила Федоровна
Доктор биологических наук, профессор, заведующая
лабораторией молекулярных механизмов
канцерогенеза, Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной и
трансляционной медицины»

Трифонов Владимир Александрович
Доктор биологических наук, профессор, заведующий
лабораторией сравнительной геномики, Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН

Защита диссертации состоится « » 2023 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного Совета ИХБФМ.03.01 при Федеральном государственном
бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 630090, г.
Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте
<http://www.niboch.nsc.ru>

Диссертация в виде научного доклада разослана «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Кандидат химических наук

П. Е. Пестряков

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы исследования и степень ее разработанности

Большинство онкологических заболеваний являются возраст-ассоциированными, то есть вероятность их возникновения увеличивается с возрастом. Благодаря успехам медицины средняя продолжительность жизни за последние сто лет существенно выросла. Однако, в целом население России постарело, так как люди живут дольше, при этом снижается рождаемость и повышается средний возраст женщин на момент рождения первого ребенка, зачастую, единственного в семье. Наряду с ухудшением экологической обстановки и рядом других факторов, это вызвало значительный рост заболеваемости возраст-ассоциированными патологиями, в том числе, злокачественными новообразованиями (ЗНО) (*Под ред. Каприна и др., Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность), 2020, ISBN 978-5-85502-260-5*).

Современная система здравоохранения нацелена на увеличение активной фазы жизни и улучшение ее качества. Важнейшая роль отводится профилактике и раннему выявлению возраст-зависимых заболеваний, а также повышению вовлеченности пациента в вопросы, связанные с поддержанием его здоровья, и персонализированному подходу со стороны врача. Эта концепция получила название 4П-медицины.

Очевидно, что на новый уровень оказания медицинской помощи, тем более, в условиях старения населения, можно выйти только при стремительном развитии науки. Особую важность приобретают исследования, направленные на изучение общих механизмов старения организмов, а также отдельных патологических процессов, приводящих к возникновению и прогрессии конкретных возраст-ассоциированных патологий, в том числе, ЗНО.

Злокачественные новообразования возникают в результате глобальных нарушений генома, которые затрагивают десятки и сотни генов. Для перерождения нормальной клетки в злокачественную необходим целый ряд генетических и эпигенетических изменений, которые позволили бы ей бесконтрольно делиться и избегать защитных систем организма. Это комплексный и многостадийный процесс, в результате которого происходит нарушение многих сигнальных и метаболических путей, однако существует и ряд общих закономерностей (hallmarks of cancer), которые потенциально дают возможность создавать и применять лекарства для большого числа пациентов с различными видами рака (*Senga et al, Open Biol., 2021, 200358; Fouad et al, Am J Cancer Res., 2017, 7, 1016-1036; Pavlova et al, Cell Metab., 2016, 23, 27*).

Одной из универсальных характеристик злокачественных новообразований является нарушение энергетического обмена (*Sawayama et al, Int J Oncol., 2014, 45, 1345*) [42]. В настоящее время известно, что прогрессия многих ЗНО ассоциирована с активацией метаболизма глюкозы. В большинстве случаев происходит переключение с

митохондриального дыхания на гликолиз, протекающий в цитоплазме, и его активация [43]. Существование особого, так называемого «ракового обмена», было описано еще в 1926 г. Отто Варбургом, сделавшим это открытие при сравнении злокачественных клеток с нормальными тканями (*Warburg et al, J. Gen. Physiol., 1927, 8, 519*). Нормальные ткани интенсивно поглощают кислород, характеризуются высоким уровнем дыхания и эффектом Пастера (подавление гликолиза дыханием).

Первоначально Варбург выдвинул гипотезу о том, что в раковых клетках образуется дефект в митохондриях, что приводит к необратимым нарушениям аэробного дыхания и последующей зависимости от гликолитического метаболизма, компенсирующего энергетическую неполноценность поврежденного дыхания (*Warburg et al, J. Gen. Physiol., 1927, 8, 519*). Он показал, что раковые клетки продолжают использовать гликолиз для получения энергии даже тогда, когда кислород присутствует в тканях в достаточном количестве. Это явление получило название эффекта Варбурга. В настоящее время известно, что использование гликолиза в качестве основного источника АТФ происходит не только в качестве вынужденной меры из-за условий гипоксии/псевдогипоксии и нарушения функций митохондрий, а также из-за необходимости использовать промежуточные продукты обмена в условиях активного роста и деления клеток (*Senga et al, Open Biol., 2021, 200358; Vander Heiden et al, Science, 2009, 324, 1029*).

Для большинства нозологических категорий ЗНО крайне актуальной задачей является поиск дополнительных диагностических, прогностических и предиктивных молекулярно-генетических маркеров [1, 6, 9-12, 27, 47, 49, 50, 52, 65, 67] (*Zhikrivetskaya et al, Oncotarget, 2017, 8, 25756*). В рамках концепции персонифицированной медицины предполагается оптимизировать тактику лечения, в том числе, благодаря воздействию на определенные, характерные для данного пациента нарушения, или правильно определяя степень агрессивности опухоли. Одним из относительно универсальных процессов, обогащенных потенциальными прогностическими маркерами, является энергетический метаболизм опухолевых клеток. Например, лактат, гиперпродуцируемый опухолевыми клетками, вследствие анаэробного гликолиза, разрушает межклеточный коллагеновый матрикс, что является одним из факторов метастазирования (*Hanahan et al, Cell, 2011, 144, 646*). Данный факт подтверждает предположение о том, что способность опухолей к метастазированию и высокий риск возникновения рецидивов связаны со снижением уровня окислительного фосфорилирования и одновременной активацией гликолиза. Например, повышенное содержание лактата в опухоли служит негативным прогностическим критерием у больных раком головы и шеи, толстой кишки, прямой кишки и шейки матки (*Moreno-Sánchez et al, Biofactors, 2009, 35, 209*).

Происходящие в опухолевых клетках события способствуют развитию целой серии изменений, одним из которых является нарушение процесса апоптотической гибели (*Locasale et al, Cell Cycle, 2010, 9, 4253*). Активация гликолиза при малигнизации

– твердо установленный экспериментальный факт. Однако ее конкретные механизмы в опухолевых клетках остаются во многом не расшифрованными (*Pavlova et al, Cell Metab., 2016, 23, 27*). Существует недостаток в комплексных, омиксных исследованиях различных аспектов нарушения энергетического обмена как на уровне конкретных механизмов регуляции отдельных генов, так и на уровне построения генных и метаболических сетей. Особую роль в таких исследованиях приобретают высокопроизводительные методы анализа совместно с новыми биоинформатическими подходами. Расшифровка молекулярных механизмов сложных метаболических процессов играет как фундаментальную, так и важнейшую прикладную роли, позволяя искать мишени для терапии онкологических заболеваний и основные классы биомаркеров для различных видов злокачественных новообразований. Очень важны исследования наиболее распространенных и социально значимых нозологий, но особую значимость приобретают работы, связанные с редкими опухолями, например, парагангиомами. Это нетипичный случай, когда нарушение энергетического обмена вызвано не столько гипоксией или псевдогипоксией, сколько герминальными и соматическими мутациями в генах, кодирующих ферменты цикла трикарбоновых кислот [27-29, 48] (*Snezhkina et al, BMC Med Genomics, 2018, 11(Suppl 1), 17, Snezhkina et al, Int J Mol Sci., 2020, 21, 6950*).

На организменном уровне процесс энергетического обмена становится еще более сложным (*Kubicka et al, Int J Mol Sci., 2021, 22, 9507*). Например, в опухолях толстой кишки не наблюдается такой же значимой активации гликолиза, как в ряде других нозологий, при этом в ряде случаев выявляется даже его слабое подавление, коррелирующее с увеличением общей и безрецидивной выживаемости. Известно, что при колоректальном раке активация гликолиза коррелирует с наличием гиперметилированного (CIMP+) фенотипа, который, в свою очередь, связан с привлечением в опухоль лимфоцитов [47], (*Cancer Genome Atlas, Nature, 2012, 487, 330; Zhang et al, Nature, 2014, 513, 382*). Необходимы комплексные широкомасштабные мультидисциплинарные исследования для анализа данных по герминальным и соматическим мутациям, по экспрессии мРНК и ее регуляции при помощи транскрипционных факторов, метилирования, микроРНК и днРНК, по составу микробиоты кишечника и короткоцепочечных жирных кислот, в совокупности определяющих иммунный статус организма, и др. Это позволит сформировать целостное представление о молекулярном патогенезе заболеваний, а также выделить варианты их течения и клинически значимые прогностические маркеры. Такие данные особенно важны при исследовании социально-значимых часто встречающихся нозологических категорий, таких как колоректальный рак (КРР), рак предстательной железы (РПЖ), рак молочной железы (РМЖ), рак легкого (РЛ), рак почки (РП). Помимо этого, существует значительное разнообразие клинико-морфологических характеристик в пределах каждой нозологической категории, поэтому различные гистологические подтипы,

например, плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ) и аденокарцинома (АК), а также светлоклеточный рак почки (СРП) и папиллярный рак почки (ПРП), следует исследовать отдельно.

В работе рассматриваются процессы, связанные с нарушением нормального энергетического обмена в клетках животных, и возможность их использования для коррекции биологического возраста, а также для диагностики и лечения злокачественных опухолей. Существующие в литературных источниках данные свидетельствуют о наличии тканеспецифических и ряда других различий в процессе нарушения энергетического обмена при разных нозологических категориях ЗНО. Это вызывает необходимость их детального исследования для обеспечения возможности персонализированного подхода к лечению онкологических больных в рамках концепции 4П-медицины. Исходя из вышеизложенного, были сформулированы цель и задачи исследования.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлся комплексный анализ молекулярно-генетических нарушений, влияющих на энергетический обмен опухолевых клеток, и оценка потенциала их применения в клинической практике.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать на основе базы данных «TCGA» онко-ассоциированные изменения экспрессии генов, продукты которых участвуют в энергетическом обмене и его регуляции при КРР, РПЖ, РМЖ, РЛ (ПРЛ и АК), РП (СРП и ПРП), и валидировать результаты на российской популяции методом количественной ПЦР;
2. Определить ключевые механизмы онко-ассоциированного изменения экспрессии ряда генов, вовлеченных в энергетический обмен, при различных нозологических категориях ЗНО;
3. Проанализировать потенциал применения выявленных молекулярно-генетических нарушений (экспрессионных, эпигенетических и генетических) в качестве прогностических и предиктивных маркеров, а также терапевтических мишеней;
4. Провести анализ корреляций между нарушением энергетического обмена и плотностью метилирования генома опухолей;
5. Определить связь повышения плотности метилирования генома опухоли при КРР, РПЖ, РМЖ, РЛ, РП с наличием определенных драйверных мутаций;
6. Выявить специфические особенности энергетического обмена опухолевых клеток при КРР в контексте их взаимодействия с метаболитами кишечной микробиоты и с учетом возраст-ассоциированных процессов в организме;
7. Рассмотреть нарушения метаболизма, вызывающие возникновение опухолей, в аспекте возраст-зависимых изменений.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Особенности опухолевого метаболизма изучаются уже длительное время, однако крайне мало работ, где одновременно анализируют данные различных высокопроизводительных платформ именно в этом аспекте, причем для нескольких нозологий одновременно. С другой стороны, существует ряд сформулированных концепций, которые описывают происходящие в опухолевых клетках нарушения энергетического обмена, однако информация об особенностях функционирования конкретных генов, вовлеченных в этот процесс, зачастую отсутствует. Масштабный анализ нарушения энергетического обмена на уровне изменения экспрессии генов, механизмов этих изменений и их клинической значимости в данной работе проведен впервые.

Идентификация особенностей нарушения энергетического обмена в опухолевых клетках при различных злокачественных новообразованиях имеет первостепенную практическую значимость, так как исследования выполнены для нозологических форм злокачественных опухолей с высокой встречаемостью, которые относятся к социально-значимым заболеваниям. Все работы выполнялись в тесном сотрудничестве с ведущими онкологическими клиниками Москвы, что позволило собрать максимально полную информацию о пациентах и сопоставить необходимые клинические признаки с наблюдаемым молекулярным портретом опухолей.

Основные гены, функционирование которых связано с энергетическим обменом и нарушено в различных видах опухолей, проанализированы в аспекте применимости в качестве потенциальных прогностических и предиктивных маркеров, что важно для оценки возможности внедрения в клиническую практику.

Выявление корреляции нарушения энергетического обмена и наличия фенотипа, связанного с множественным метилированием промоторных участков генов (СИМР+ - CpG Island Methylator Phenotype, или НМ-фенотип, hypermethylated), при РПЖ и КРР на клиническом материале проливает свет на некоторые аспекты установления этого фенотипа и объясняет, в частности, факт того, что СИМР+ фенотип при КРР, как и активация фермента первой стадии гликолиза гексокиназы 1 (HK1), считаются маркерами неблагоприятного прогноза.

Анализ патогенеза КРР в аспекте развития опухолей в окружении микробиоты кишечника и ее метаболитов позволяет объяснить затруднения визуализации первичных образований и метастазов на ПЭТ-КТ с использованием меченой глюкозы.

Методология и методы диссертационного исследования

В диссертационной работе использовали комплексный молекулярно-биологический подход, включающий: (1) методы биоинформатики для анализа мутаций, дифференциальной экспрессии генов, альтернативного и aberrантного сплайсинга; (2) экспериментальные методы анализа экспрессии генов, в том числе

высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina; (3) иммуногистохимические методы окрашивания препаратов тканей; (4) методы работы с клеточными линиями.

Положения, выносимые на защиту

1. В исследованных ЗНО существует тенденция к активации гликолиза и подавлению цикла трикарбоновых кислот, однако в каждой нозологической категории молекулярно-генетические механизмы этих процессов различаются – нет генов, которые универсально активируются или инактивируются, при этом повышенная экспрессия гексокиназ зачастую является маркером агрессивного течения заболевания и неблагоприятного прогноза.
2. Повышение уровня экспрессии гена *HK3* коррелирует с экспрессией семи генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом при КРР.
3. Для КРР и РПЖ гиперметилирование генома ассоциировано с активацией гликолиза.
4. Ген *OGDHL* является одним из маркеров СІМР+ фенотипа при КРР: его экспрессия подавляется, что обеспечивается, главным образом, за счет метилирования промотора.
5. Активация метаболизма полиаминов при КРР в большей степени обусловлена регуляцией Мус и С/ЕВРβ, нежели инфекцией ЕТВВ.
6. При КРР энергетический обмен происходит нетипичным образом, так как при возникновении гипоксии/псевдогипоксии, вместо глюкозы клетка может использовать бутират, синтезируемый микрофлорой кишечника.
7. При экспериментальном подавлении гексокиназы 2 на модели КРР клетки быстро адаптируются, поэтому для использования энергетического обмена в качестве терапевтической мишени необходимо одновременно инактивировать несколько генов.
8. Нарушение энергетического обмена характерно для большинства стареющих организмов, что ассоциировано и с манифестацией возраст-зависимых заболеваний, в том числе, онкологических. Стратегия их профилактики, а также активного долголетия в целом, может быть связана с воздействиями на стресс-ассоциированные гены, влияющие на адаптацию к экстремальным условиям внешней среды и экспрессирующиеся на высоком уровне у видов-долгожителей.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа соответствует формуле специальности: «1.5.3 – Молекулярная биология», охватывающей проблемы, связанные с исследованием биополимеров, их компонентов и комплексов, структуры и функции генов и геномов. Работа рассматривает такие области исследований, как «Геномы, их структура и функция», «Биосинтез нуклеиновых кислот и белка», «Молекулярная биология клетки», «Генная, белковая и клеточная инженерия», а также «Биоинформатика».

Личный вклад автора в проведение исследования

Автор диссертации является непосредственным автором концепции исследования, лично автором сформулированы цели и задачи, осуществлен выбор методов исследования, в значительной степени самостоятельно проведена обработка экспериментального и статистического материала. Автор лично организовывала все этапы проведения исследований, интерпретировала полученные данные, основные экспериментальные работы проводила самостоятельно. Все публикации по теме диссертационной работы подготовлены с личным участием и определяющим вкладом автора.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 79 статьях в рецензируемых научных журналах и 4 патентах. Из 79 статей 43 опубликованы за последние 10 лет в изданиях первого и второго квартилей (Q1 и Q2, соответственно), индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Материал и методы исследования

Основными экспериментальными методами исследований являлись высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina с последующим биоинформатическим анализом, автоматическое секвенирование по Сэнгеру, в том числе, бисульфитное секвенирование, ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии генов, а также аллель-специфическая ПЦР. Помимо этого, применялись методы работы с культурами клеток и методы гистологического анализа. Все полученные данные были обработаны при помощи соответствующих статистических методов.

Образцы тканей были собраны в филиалах НМИЦ радиологии Минздрава РФ и в НМИЦ хирургии имени А. В. Вишневского Минздрава РФ (Д. В. Калинин). Все опухолевые образцы, включенные в исследование, охарактеризованы в Патологоанатомических отделениях Центров и содержат не менее 70% опухолевых клеток. Особенно тесным и продуктивным было сотрудничество с ведущими онкоурологами и онкопатологами страны, Б. Я. Алексеевым, К. М. Ньюшко, а также Н. Н. Волченко и Г. Д. Ефремовым, работающими под руководством академика А. Д. Каприна в НМИЦ радиологии. Большую роль в этом исследовании также сыграл Д. С. Михайленко, ключевой специалист в области молекулярной патологии РПЖ.

Анализ мутаций и статуса метилирования. Выделение ДНК из свежзамороженных образцов опухолевой и прилежащей гистологически неизменной ткани проводили с использованием набора High Pure DNA Isolation Kit (Roche). Анализ метилирования проводили с использованием метода бисульфитного секвенирования.

Анализ мутаций генов проводили методом экзомного секвенирования. ДНК из парафиновых блоков выделяли при помощи набора High Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche). Библиотеки для секвенирования экзома готовили с использованием набора Rapid Capture Exome Kit (Illumina) или TruSeq Exome Library Prep Kit (Illumina) согласно протоколу производителя. Секвенирование проводили на приборе NextSeq 500 System (Illumina) в режиме парноконцевых прочтений 76×2 п.н. Среднее покрытие для каждого образца составляло как минимум 300X.

Анализ микробиома. ДНК из образцов стула после гомогенизации выделяли при помощи набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) на автоматической системе для выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure Compact Instrument (Roche). Секвенирование образцов кишечной микробиоты проводили на приборе MiSeq (Illumina). Фрагменты гена 16S рибосомальной РНК анализировали в режиме парноконцевых прочтений, длина которых составила 250 или 300 нуклеотидов с каждой стороны, в зависимости от используемой версии набора реагентов.

Анализ экспрессии генов. Тотальную РНК из тканей и клеточных культур выделяли при помощи набора MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche). Концентрацию выделенных нуклеиновых кислот измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). РНК из парафиновых блоков выделяли при помощи набора High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche).

Подготовку транскриптомных библиотек РПЖ и КРР проводили с использованием набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina). Концентрацию полученных библиотек измеряли на флуориметре Qubit 2.0, оценку качества проводили на Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Библиотеки валидировали с помощью метода количественной ПЦР на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen) с построением стандартной кривой. Высокопроизводительное секвенирование осуществляли на приборе NextSeq 500 System (Illumina) на базе ЦКП «Геном» ИМБ РАН. Длина чтения для библиотек составила 75 нуклеотидов. Далее проводили псевдовыравнивание прочтений на референсный геном человека (GRCh37/hg19) с использованием программного пакета Kallisto и подсчёт числа прочтений на ген с последующей нормализацией числа транскриптов на миллион (TPM) с помощью утилиты featureCounts.

Количественную оценку уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (кПЦР) проводили в режиме относительных измерений. В качестве контрольных были выбраны гены *RPNI* и *GUSB*. Использовали валидированные наборы праймеров и зондов компании ThermoFisher Scientific. Измерения проводили на приборе ABI Prism 7500 (Applied Biosystems).

Более подробно методы исследований, как и сведения об используемых выборках образцов, рассмотрены в соответствующих разделах при описании результатов работы.

2. Идентификация нарушений экспрессии генов, продукты которых участвуют в энергетическом обмене и его регуляции при ЗНО

2.1. Биоинформатический анализ базы данных «TCGA»

После детального анализа литературных данных о нарушении энергетического обмена в опухолевых клетках и его потенциальной практической роли [42,43], базовым этапом было создание программного обеспечения для анализа данных высокопроизводительного секвенирования и поиска факторов, приводящих к нарушению экспрессии генов (совместно с Г. С. Красновым и А. А. Дмитриевым). Разрабатывали отдельные блоки для решения частных задач, которые впоследствии были объединены в программный пакет CrossHub и опубликованы [44]. Схема работы CrossHub представлена на рисунке 1.

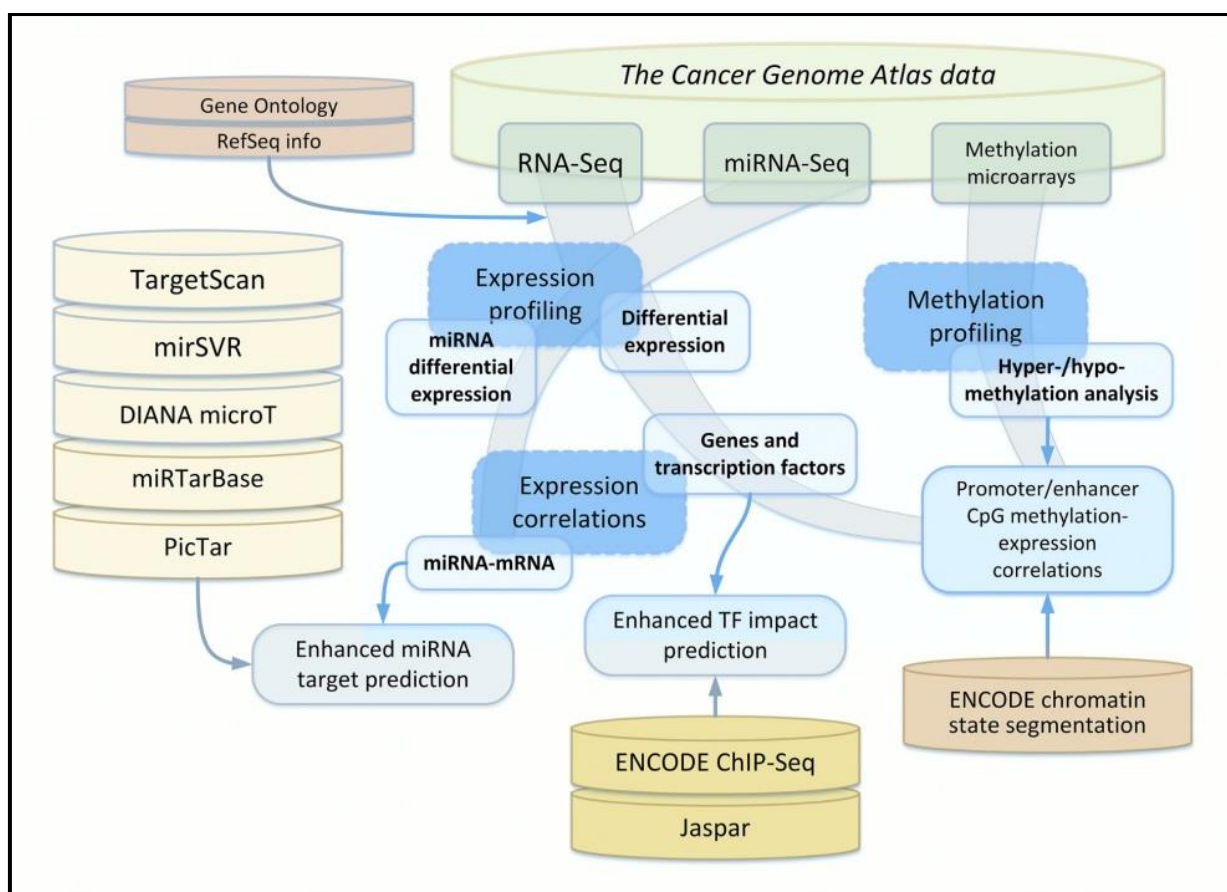


Рис.1. Схема работы и иллюстрация возможностей программного пакета CrossHub [44].

CrossHub осуществляет анализ данных консорциума «TCGA» (The Cancer Genome Atlas, <https://portal.gdc.cancer.gov/>) или аналогичных по структуре данных по нескольким важным направлениям:

1. Анализ дифференциальной экспрессии (анализ мРНК, в том числе, альтернативных транскриптов, профилирование микроРНК).
2. Предсказание регуляции экспрессии мРНК при помощи микроРНК (использование ресурсов TargetScan, DIANA microT, mirSVR, PicTar, miRTarBase, а также анализ коэкспрессии).
3. Предсказание регуляции экспрессии мРНК при помощи транскрипционных факторов (ТФ) (использование ресурсов ENCODE, ChIP-Seq, а также анализ коэкспрессии).
4. Предсказание регуляции экспрессии генов посредством метилирования ДНК (анализ метилома).
5. Корреляционный анализ, демонстрирующий ассоциации между уровнем экспрессии генов и клинико-патологическими характеристиками (TNM-стадия, данные о наличии рецидива, эффективность ответа на терапию и др.).

При помощи биоинформатического анализа транскриптомных данных были идентифицированы онко-ассоциированные изменения в генах, продукты которых участвуют в энергетическом обмене и его регуляции при КРР, РПЖ, РМЖ, РЛ (ПРЛ и АК), РП (СРП и ПРП) [7, 13, 17, 23, 30, 44, 45, 51, 66]. Для первичного анализа использовали данные международного ресурса «TCGA». Результаты, полученные для различных нозологических категорий, суммированы в таблицах 1 и 2. На рисунках 2 и 3 в качестве примера приведены данные анализа экспрессии генов в образцах КРР. Данные выдаются программой в том же формате, как они представлены в базе KEGG, поэтому на рисунках показаны не только исследуемые в работе пути, но и наиболее близко сопряженные с ними. Красным и зеленым отмечены повышения и понижения уровня экспрессии, соответственно. Причем на каждом рисунке максимальная интенсивность окраски соответствует максимальному уровню экспрессии для генов, включенных в анализ, то есть варьирует между рисунками, шкала является относительной. При автоматической выдаче результатов некоторые гены объединяются в группы, например, гексокиназы. Ввиду важности для исследования, показатели вручную были внесены на рисунок для каждого подобного случая.

Пул транскриптомов опухолевых образцов сравнивали с пулом прилежащих условно нормальных (гистологически неизмененных) тканей. В первичном анализе образцы не разделяли на молекулярные подтипы и включали в выборку максимальное количество образцов, представленных в ресурсе «TCGA». В дальнейших исследованиях были проанализированы отдельные молекулярные подтипы.

Таблица 1. Относительное изменение экспрессии генов, вовлеченных в цикл трикарбоновых кислот и его регуляцию в изученных нозологических категориях ЗНО.

Ген	KPP		PIDЖ		PMЖК		IKP		AK		CPII		PII	
	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value
	<i>PCK1</i>	-3,147	8,65E-37	-4,414	1,24E-21	-0,834	4,27E-24	2,205	3,73E-05	-2,855	7,46E-25	-2,989	1,29E-08	-1,303
<i>SUCLG2</i>	-1,498	5,94E-52	-0,347	1,12E-04	1,910	4,54E-24	1,704	6,59E-42	-1,483	2,05E-24	-0,645	9,83E-05	-0,899	9,93E-20
<i>SDHD</i>	-1,275	3,76E-25	-0,516	4,53E-07	-1,519	4,63E-21	0,332	9,50E-04	-1,483	2,05E-24	-0,755	8,67E-08	-1,483	2,05E-24
<i>PC</i>	-1,030	1,65E-08	-0,576	5,48E-03	0,301	3,25E-03	0,301	3,25E-03	1,704	6,59E-42	-1,275	7,57E-07	-0,589	1,66E-09
<i>IDH3A</i>	-0,896	4,78E-27	-0,410	1,42E-03	0,258	5,73E-03	0,258	5,73E-03	1,704	6,59E-42	-0,69	1,77E-04	-1,847	3,89E-102
<i>SUCLG1</i>	-0,839	3,76E-14	-0,266	2,92E-03	0,549	1,00E-05	0,295	1,26E-03	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-1,847	3,89E-102
<i>ACO2</i>	-0,825	6,61E-10	-0,476	2,96E-07	-0,376	6,44E-08	0,295	1,26E-03	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,615	4,34E-10
<i>SDHB</i>	-0,705	2,42E-11	-0,376	6,44E-08	0,295	1,26E-03	0,295	1,26E-03	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,873	1,12E-40
<i>PCK2</i>	-0,696	8,05E-05	0,549	1,00E-05	0,295	1,26E-03	0,295	1,26E-03	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,873	1,12E-40
<i>MDHI</i>	-0,636	1,24E-12	-0,476	2,96E-07	0,851	6,70E-18	0,851	6,70E-18	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,873	1,12E-40
<i>SDHA</i>	-0,614	7,56E-05	-0,376	6,44E-08	0,657	5,01E-13	0,657	5,01E-13	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,873	1,12E-40
<i>DLST</i>	-0,538	1,29E-11	-0,376	6,44E-08	0,851	6,70E-18	0,851	6,70E-18	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,873	1,12E-40
<i>DLD</i>	-0,520	1,06E-11	-0,208	2,06E-02	0,421	5,19E-06	0,421	5,19E-06	0,582	4,01E-12	-0,562	7,61E-03	-0,873	1,12E-40
<i>OGDH</i>	-0,499	1,83E-05	-0,189	3,30E-02	0,505	1,75E-08	0,505	1,75E-08	0,449	3,00E-09	-0,5	1,88E-03	-0,603	1,63E-13
<i>DLAT</i>	-0,408	2,72E-06	0,413	1,38E-05	0,243	4,01E-03	0,243	4,01E-03	0,378	3,07E-07	-0,369	1,78E-02	-0,719	5,44E-19
<i>PDHB</i>	-0,402	7,60E-07	0,413	1,38E-05	0,354	4,89E-07	0,354	4,89E-07	0,378	3,07E-07	-0,369	1,78E-02	-0,719	5,44E-19
<i>FH</i>	-0,383	1,65E-04	0,534	1,13E-07	0,703	3,26E-15	0,703	3,26E-15	0,601	2,55E-15	-0,339	8,14E-03	-0,922	2,50E-34
<i>IDHI</i>	-0,371	2,18E-04	0,540	6,07E-04	0,834	1,11E-09	0,834	1,11E-09	0,824	3,40E-11	-0,634	1,38E-04	-0,634	8,94E-11
<i>SDHC</i>	-0,330	1,22E-06	0,471	6,88E-08	0,448	5,87E-09	0,448	5,87E-09	0,451	3,18E-09	-0,502	8,11E-06	-0,763	2,06E-27
<i>CS</i>	-0,261	1,83E-04	-0,279	3,36E-03	0,437	2,89E-10	0,437	2,89E-10	0,307	1,79E-05	-0,386	1,12E-09	-0,386	1,12E-09
<i>ACO1</i>	-0,261	5,53E-03	-0,524	3,02E-05	-0,755	7,80E-10	-0,755	7,80E-10	0,307	1,79E-05	-1,026	9,01E-09	-1,155	1,05E-41
<i>SUCLA2</i>	-0,255	1,27E-02	-0,391	6,37E-03	0,609	1,24E-12	0,609	1,24E-12	-0,163	3,45E-02	-0,637	4,68E-05	-1,064	5,42E-42
<i>MDH2</i>	0,422	1,45E-04	0,581	3,30E-09	0,360	2,15E-05	0,360	2,15E-05	0,689	2,44E-17	-0,386	1,68E-06	-0,386	1,68E-06
<i>IDH2</i>	0,579	2,16E-04	0,311	1,57E-02	1,046	3,92E-12	1,313	7,42E-30	1,090	1,16E-27	-1,128	5,50E-12	-1,128	5,33E-30
<i>ACLY</i>	0,668	1,64E-14	0,922	1,99E-09	0,550	5,36E-07	0,407	1,61E-05	0,429	4,72E-07	1,36	2,50E-04	1,36	1,74E-57
<i>IDH3G</i>	0,872	1,14E-05	0,244	4,95E-02	0,192	1,19E-02	0,192	1,19E-02	0,471	6,23E-10	-0,229	4,41E-04	-0,229	4,41E-04
<i>PDHAI</i>			-0,252	1,54E-02	0,563	7,08E-11	0,563	7,08E-11	0,255	1,54E-04	-1,224	1,47E-59	-1,224	1,47E-59
<i>OGDHL</i>			1,325	4,39E-03	3,685	5,14E-38	3,685	5,14E-38	3,381	6,69E-25	-2,058	1,49E-20	-2,058	1,49E-20
<i>IDH3B</i>					0,484	5,77E-09	0,484	5,77E-09			0,427	2,22E-03	0,427	2,22E-03

Таблица 2. Относительное изменение экспрессии генов, вовлеченных в гликолиз и его регуляцию в изученных нозологических категориях ЗНО.

Ген	КРР		РДЖ		РМЖ		ПКР		П.Л		Р.П			
	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value		
<i>G6PC</i>	-5,863	1,09E-24	2,047	1,64E-02	-1,241	4,25E-02			1,842	5,72E-03	-3,438	2,72E-26	-4,866	5,51E-14
<i>ADH1B</i>	-4,1	8,64E-37	-1,507	1,22E-06	-4,165	6,18E-23	-4,961	6,38E-44	-3,224	1,42E-31	-2,513	4,08E-19	-3,491	5,27E-13
<i>ADH1C</i>	-3,658	1,08E-30			-3,017	1,32E-17	2,260	1,96E-06	1,039	2,31E-03	-4,794	1,06E-62	-4,965	1,15E-26
<i>PKCI</i>	-3,147	8,65E-37			-4,414	1,24E-21			2,205	3,73E-05	-2,855	7,46E-25	-2,989	1,29E-08
<i>ADH6</i>	-1,533	4,46E-11			-1,348	7,08E-07					-2,647	1,68E-34	-2,182	2,03E-07
<i>PGMI</i>	-1,443	5,85E-33	-0,527	3,36E-06	-1,335	1,23E-26	-0,958	1,71E-15	-0,677	1,21E-13	0,294	5,79E-04		
<i>ADH1A</i>	-1,268	1,03E-03			-3,856	1,66E-25	-2,585	2,09E-21	-2,037	6,83E-12	-1,874	7,97E-16	-1,231	1,44E-02
<i>HK2</i>	-1,261	3,50E-15	0,833	9,51E-05			1,144	2,47E-11			3,401	5,98E-128	3,592	1,46E-57
<i>G6PC2</i>	-1,215	3,91E-03			-0,979	3,09E-02	-2,516	5,22E-06	-2,877	2,19E-18	1,284	1,09E-06		
<i>GALM</i>	-1,113	6,31E-27	-0,941	6,16E-04			-0,797	7,95E-08	0,441	4,72E-05	-1,191	4,49E-44	-0,84	7,38E-06
<i>GCK</i>	-0,911	8,91E-07	-1,396	7,03E-11	-0,774	1,95E-03	1,238	2,03E-05			-0,555	9,31E-03		
<i>ACSS2</i>	-0,887	1,03E-10	-0,332	3,95E-04	-1,561	9,41E-44	-1,020	4,41E-25	-0,663	5,12E-09	-0,749	2,36E-22	0,708	1,04E-03
<i>ALDH3A2</i>	-0,819	5,16E-21			-0,387	3,81E-02					-0,7	1,09E-10	-0,421	6,46E-03
<i>LDHAL6B</i>	-0,78	2,64E-02	-1,048	1,25E-02	-0,836	1,35E-03			0,628	9,58E-03	0,688	6,09E-05		
<i>PCK2</i>	-0,696	8,05E-05			0,549	1,01E-04			-0,257	6,94E-03	-2,338	2,99E-76	-2,211	8,04E-17
<i>ADH5</i>	-0,682	2,44E-12	-0,390	5,40E-03	-0,830	1,23E-31			-0,299	4,68E-04	-0,6	9,02E-22	-0,564	2,67E-05
<i>ALDH2</i>	-0,548	3,30E-07	-0,826	6,13E-04	-2,043	2,43E-23	-2,120	1,56E-45	-1,192	3,38E-18	-0,879	1,06E-19		
<i>DLSD</i>	-0,52	1,06E-11			-0,208	2,06E-02	0,421	5,19E-06			-0,959	6,38E-30		
<i>ALDH9A1</i>	-0,443	2,36E-11							-0,206	9,28E-03	-0,766	1,05E-29	-0,86	1,78E-08
<i>DLAT</i>	-0,408	2,72E-06					0,243	4,01E-03	0,378	3,07E-07	-0,719	5,44E-19	-0,369	1,78E-02
<i>PDHB</i>	-0,402	7,60E-07			0,413	1,38E-05	-0,354	4,89E-07			-1,181	7,70E-68	-0,339	8,14E-03
<i>BPGM</i>	-0,332	2,23E-03			0,437	1,32E-06			0,245	3,61E-02	-0,422	4,19E-07		
<i>TPH</i>	0,295	2,19E-02			0,616	9,07E-08	1,712	1,27E-55	1,094	6,50E-29	0,993	4,30E-41	0,644	5,24E-07
<i>PFKP</i>	0,326	3,96E-02	-0,563	2,09E-05			1,739	4,16E-40	2,082	2,31E-40	1,945	1,85E-91	0,874	8,27E-09
<i>LDHA</i>	0,38	9,47E-04	0,523	1,49E-04	0,502	7,29E-05	1,385	6,70E-29	1,308	8,46E-36	1,712	3,95E-100	0,657	5,25E-04
<i>ALDH3B1</i>	0,424	7,47E-03	-0,980	2,81E-10			-3,182	6,13E-50	-0,825	5,07E-06	0,668	7,30E-08	1,12	4,03E-09
<i>ADPGK</i>	0,455	6,13E-09	0,747	7,78E-07	0,259	5,91E-04			-0,178	6,93E-03	0,865	3,70E-83	0,333	3,51E-04
<i>PFKM</i>	0,469	1,02E-04	-0,445	5,35E-03			0,380	9,04E-04			-1,061	1,17E-27		
<i>ALDH1B1</i>	0,6	1,53E-06	-0,611	3,24E-05	0,839	2,20E-12	0,782	9,56E-10	1,034	1,40E-19	-1,427	1,34E-31		
<i>ALDH1A3</i>	0,621	4,49E-04	1,309	7,88E-10	-1,877	1,51E-19					-1,521	9,79E-16		
<i>GPI</i>	0,65	1,65E-09	0,367	7,11E-04	0,365	6,45E-03	1,922	1,36E-47	1,086	9,39E-30	0,515	4,44E-12	0,483	2,65E-03
<i>G6PC3</i>	0,754	3,31E-12			0,823	3,89E-11			0,255	4,01E-03	-0,197	1,74E-02	0,671	2,24E-07
<i>HKDC1</i>	0,756	1,72E-03							1,706	6,71E-17	0,506	1,04E-03	0,821	7,48E-04

Таблица 2. Относительное изменение экспрессии генов, вовлеченных в гликолиз и его регуляцию в изученных нозологических категориях ЗНО. Продолжение.

Ген	KPP		PIJK		PMJK		PKP		PJL		PII	
	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value
<i>LDHB</i>	0,757	1,86E-05	-0,719	4,10E-03	-1,706	4,26E-20	0,764	3,58E-07	0,848	8,09E-09	-1,617	6,27E-86
<i>ENO1</i>	0,76	3,44E-09	0,272	4,23E-02			1,227	2,14E-27	1,201	1,57E-37	0,589	1,86E-11
<i>ACSS1</i>	0,764	3,38E-06	1,063	1,01E-27					-0,316	4,16E-02	-0,897	4,96E-22
<i>PGK1</i>	0,777	1,21E-13			0,538	4,07E-07	1,241	1,50E-22	0,735	9,19E-11	0,895	1,65E-25
<i>ALDOC</i>	0,781	9,71E-04	-0,774	1,17E-07	-2,387	4,44E-21	1,668	3,62E-23	0,720	7,27E-06	2,283	1,37E-53
<i>HK3</i>	0,803	5,01E-04			0,764	8,97E-08	-2,188	1,99E-26	-1,798	7,48E-24	2,532	1,88E-75
<i>GAPDH</i>	0,85	2,20E-08			0,789	2,79E-15	2,457	4,28E-87	1,698	8,70E-45	1,467	2,27E-63
<i>ENO3</i>	0,935	9,47E-09			0,789	2,79E-15	0,936	7,51E-08	2,612	1,84E-22		
<i>PKM</i>	0,989	2,72E-13	-0,292	3,62E-03	0,789	2,79E-15	1,386	5,75E-42	0,903	5,90E-22	0,575	4,69E-14
<i>ALDOB</i>	1,123	1,93E-03			-1,435	1,08E-12	-0,584	2,98E-02	1,824	3,67E-09	-4,63	6,62E-42
<i>GAPDH5</i>	1,558	1,45E-02					1,784	4,15E-05	1,325	1,40E-03	2,147	7,18E-07
<i>PGK2</i>	1,603	2,21E-02	2,754	6,47E-03	2,614	2,02E-02	1,829	8,75E-05	1,274	6,03E-03	0,961	1,69E-02
<i>ALDH3B2</i>	4,046	5,52E-29	1,788	1,74E-07			4,745	1,23E-98	2,735	2,73E-31	-3,786	2,79E-29
<i>ADH7</i>			-2,732	3,51E-05			5,972	7,21E-47			3,036	1,77E-08
<i>FBP2</i>			-2,525	4,62E-09							-1,57	2,03E-11
<i>ADH4</i>			-2,008	3,09E-05	-3,550	1,32E-19			1,016	7,06E-03	-1,171	2,75E-03
<i>ALDH3A1</i>			-1,659	1,83E-06			3,822	8,12E-23	1,836	9,34E-07	0,892	1,25E-08
<i>ENO2</i>			-1,393	1,10E-18	1,323	1,17E-09	1,210	4,40E-14	0,837	9,44E-09	3,23	1,17E-132
<i>LDHAL6A</i>			-0,941	3,61E-04	-0,575	2,59E-02	-0,929	2,59E-04	-0,578	1,01E-02	-0,588	1,85E-04
<i>PGAM1</i>			-0,515	6,45E-07	0,274	2,31E-03	1,193	8,51E-25	0,435	2,84E-06	0,645	5,68E-15
<i>ALDOA</i>			-0,266	2,92E-02	1,084	1,30E-14	1,338	3,74E-40	1,163	3,43E-29	1,1	6,93E-46
<i>PDHAI</i>			-0,252	1,54E-02	-0,463	8,12E-07	0,563	7,08E-11	0,255	1,54E-04	-1,224	1,47E-59
<i>HK1</i>			-0,236	1,22E-02	0,530	1,25E-10	0,490	4,22E-05				
<i>PFKL</i>			0,287	3,17E-03	0,228	3,86E-02	0,492	9,22E-08	0,315	7,87E-05	0,242	9,04E-04
<i>MINPPI</i>			0,333	2,22E-02	0,422	1,38E-06	0,321	4,72E-03	0,409	3,03E-07	-0,381	2,82E-03
<i>ALDH7A1</i>			0,393	1,45E-02	-0,677	8,58E-12			0,223	2,62E-02	-0,744	1,09E-24
<i>PGM2</i>			0,639	2,86E-11	0,287	5,28E-04	1,334	3,41E-26				
<i>AKR1A1</i>			0,742	5,70E-04	0,312	3,23E-03	0,222	1,63E-02	0,351	5,63E-06	-0,396	3,42E-05
<i>FBPI</i>					0,371	3,97E-02	-3,198	7,63E-48	-1,716	1,29E-31	-2,452	3,56E-52
<i>ENO4</i>					1,119	1,54E-13	-2,060	3,98E-25	-1,289	3,73E-10	-0,545	8,92E-10
<i>PGAM4</i>							1,035	3,69E-08	0,458	2,74E-02	0,328	1,36E-02
<i>LDHC</i>							1,313	1,70E-03			-1,481	3,42E-08
<i>PKLR</i>							2,540	1,44E-09	1,537	4,01E-04	-0,89	5,23E-04

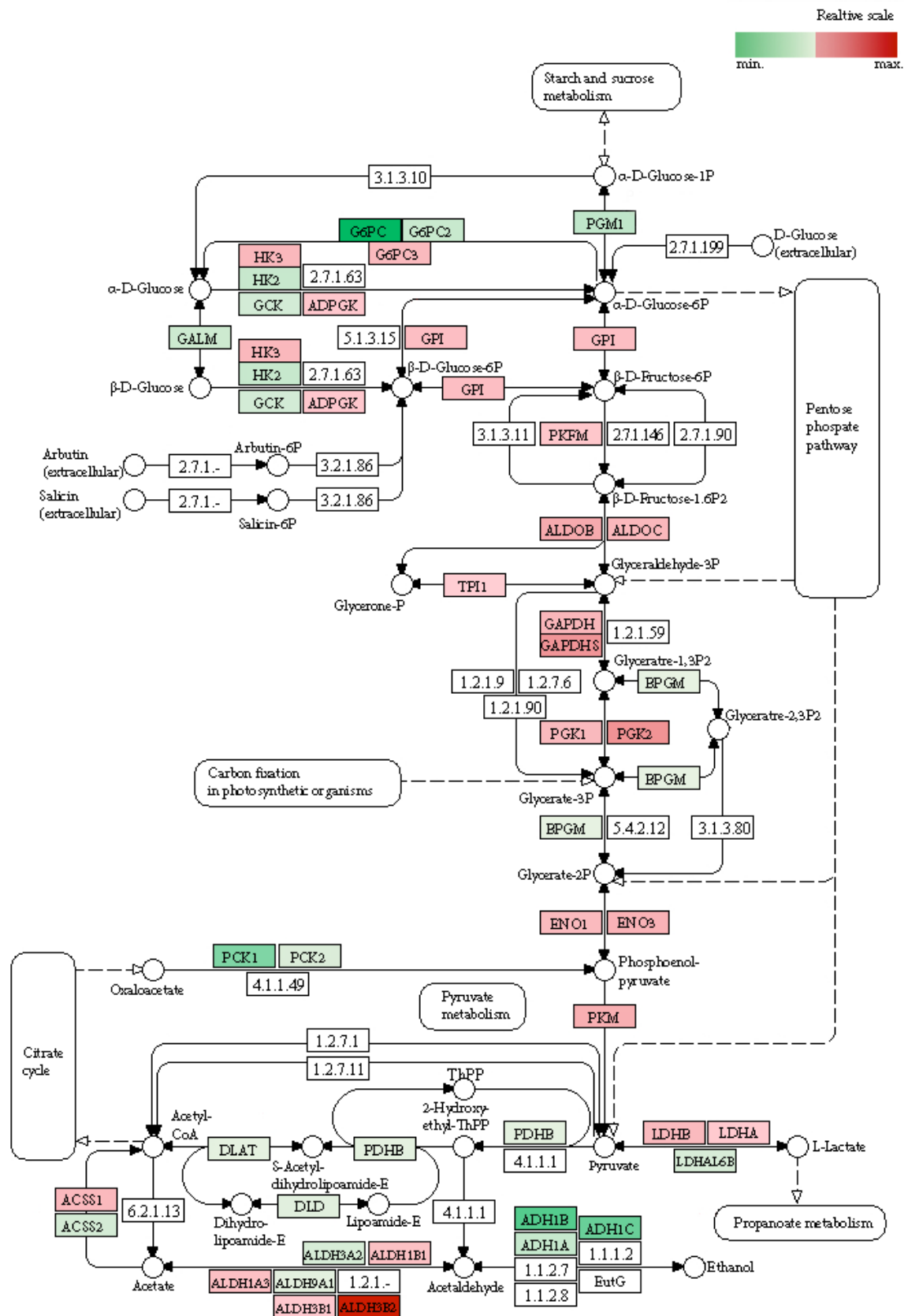


Рис. 3. Нарушения экспрессии генов, участников гликолиза, на примере колоректального рака (биоинформатический анализ, сравнение опухолевых образцов с условной нормой).

Аналогичные результаты были получены для выборок РПЖ, РМЖ, РЛ (ПРЛ и АК), РП (СРП и ПРП). Биоинформатический анализ показал, что в целом сохраняется тенденция к активации гликолиза и подавлению цикла трикарбоновых кислот, однако в КРР, РПЖ, РМЖ, РЛ (ПРЛ и АК), РП (СРП и ПРП) эти процессы отличаются. Не было выявлено генов, которые активируются или инактивируются в большинстве нозологических категорий ЗНО.

Таким образом, по степени активации генов, кодирующих ферменты гликолиза (от максимальной активации к минимальной), исследованные нозологические категории ЗНО можно расположить в следующей последовательности: ПКРЛ, АК, СРП, ПРП, РМЖ, РПЖ, КРР. То есть в образцах колоректального рака гликолиз активирован минимально.

По степени подавления экспрессии генов, кодирующих ферменты цикла трикарбоновых кислот (от максимального к минимальному), исследованные нозологические категории ЗНО можно расположить в следующей последовательности: СРП, ПРП, КРР, РМЖ, РПЖ, ПКРЛ, АК.

2.2. Экспериментальная проверка результатов биоинформатического анализа на российской популяции

Наибольший интерес с точки зрения необходимости валидации вызвали результаты транскриптомного анализа колоректального рака, так как они не соответствовали традиционному представлению об активации гликолиза как универсальном механизме перестройки энергетического метаболизма опухолевых клеток, а также частично не согласовывались с литературными данными. В большинстве работ утверждалось, что КРР практически не отличается от других нозологических категорий, то есть гликолиз в опухолевых клетках заметно активируется. Известно также, что уровень пируваткиназы М2 в кале используется для диагностики колоректального рака. Поэтому на образцах КРР в первую очередь была проведена валидация результатов, полученных биоинформатическими методами, - количественная оценка экспрессии генов на российской выборке методом ПЦР в режиме реального времени. Отдельный этап работы был посвящен выбору оптимальных контрольных генов для различных нозологических категорий ЗНО (*Краснов и др., Молекулярная биология, 2011, 45, 238*), [41]. Для возможности совместной обработки данных кПЦР с большого количества планшетов с учетом эффективности реакции было разработано программное обеспечение [5].

На 40 образцах КРР было показано, что уровень экспрессии *HK1* практически не изменяется, однако в отдельных образцах наблюдается значительное повышение *HK2* [7]. Наибольшее повышение выявлено для гена *HK3*, однако он экспрессируется в клетках на значительно более низком уровне по сравнению с остальными гексокиназами, и, скорее всего, такое событие не может опосредовать значительную активацию гликолиза. Результаты представлены на рисунке 4.

Чтобы понять роль гексокиназы 3 в изменении энергетического обмена при КРР, была собрана дополнительная выборка из 78 образцов. Результаты представлены на рисунке 5 [66]. Уровень мРНК *HK3* был повышен от 2 до 12 раз в 41% (32/78, $p < 0,01$) образцов КРР по сравнению с прилежащей условно нормальной тканью. Более чем двукратное понижение экспрессии гена *HK3* было выявлено в 14% (11/78) случаев. Среднее значение относительного уровня мРНК составило 1,7. Повышение экспрессии *HK3* не коррелировало со стадией заболевания.

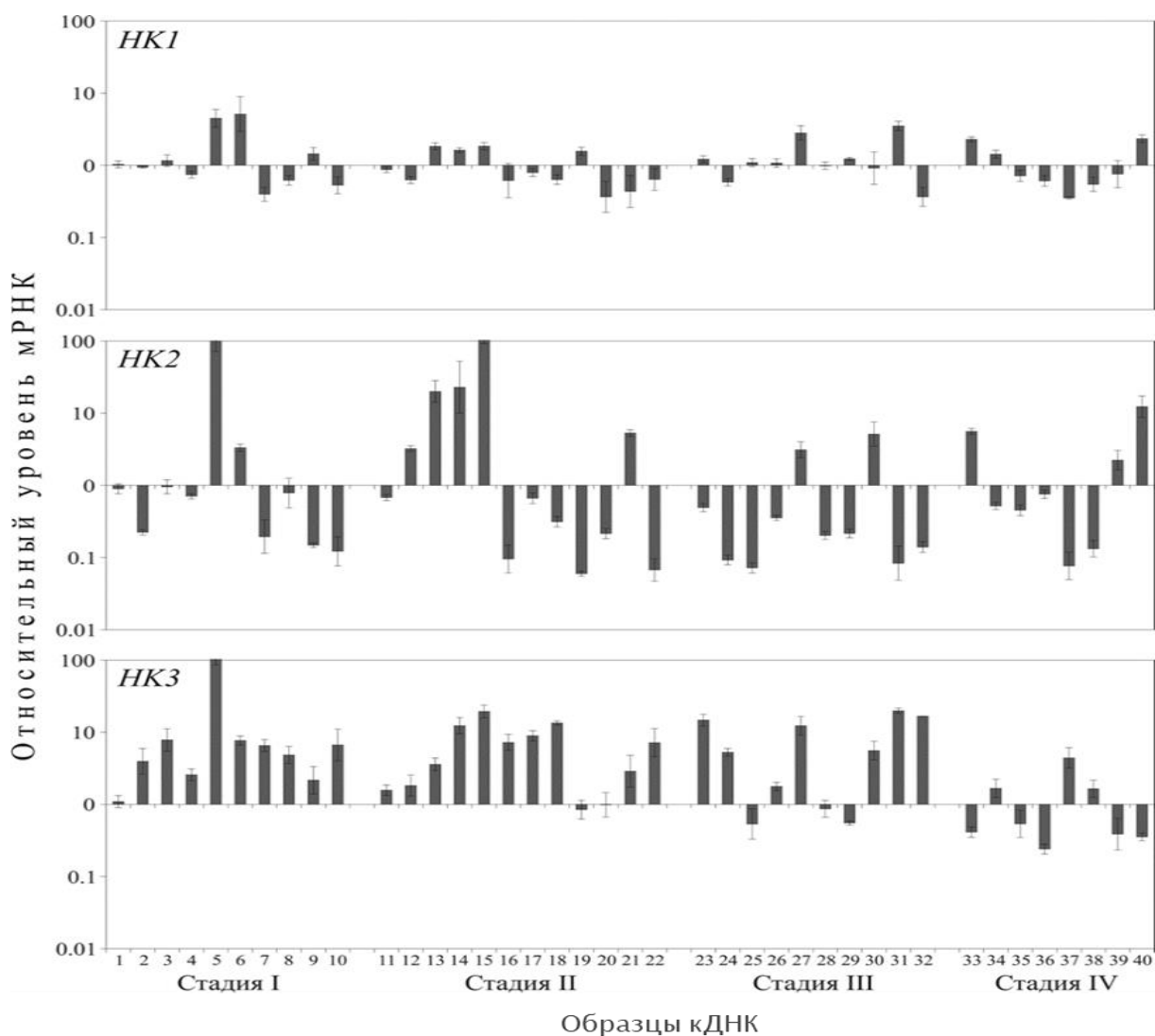


Рис. 4. Относительный уровень экспрессии генов *HK1*, *HK2*, *HK3* при КРР. Данные количественной ПЦР. В логарифмической шкале представлены средние значения изменений, а планками погрешностей – их стандартные отклонения. По оси абсцисс расположены 40 образцов колоректального рака в порядке возрастания клинической стадии заболевания (I-IV).

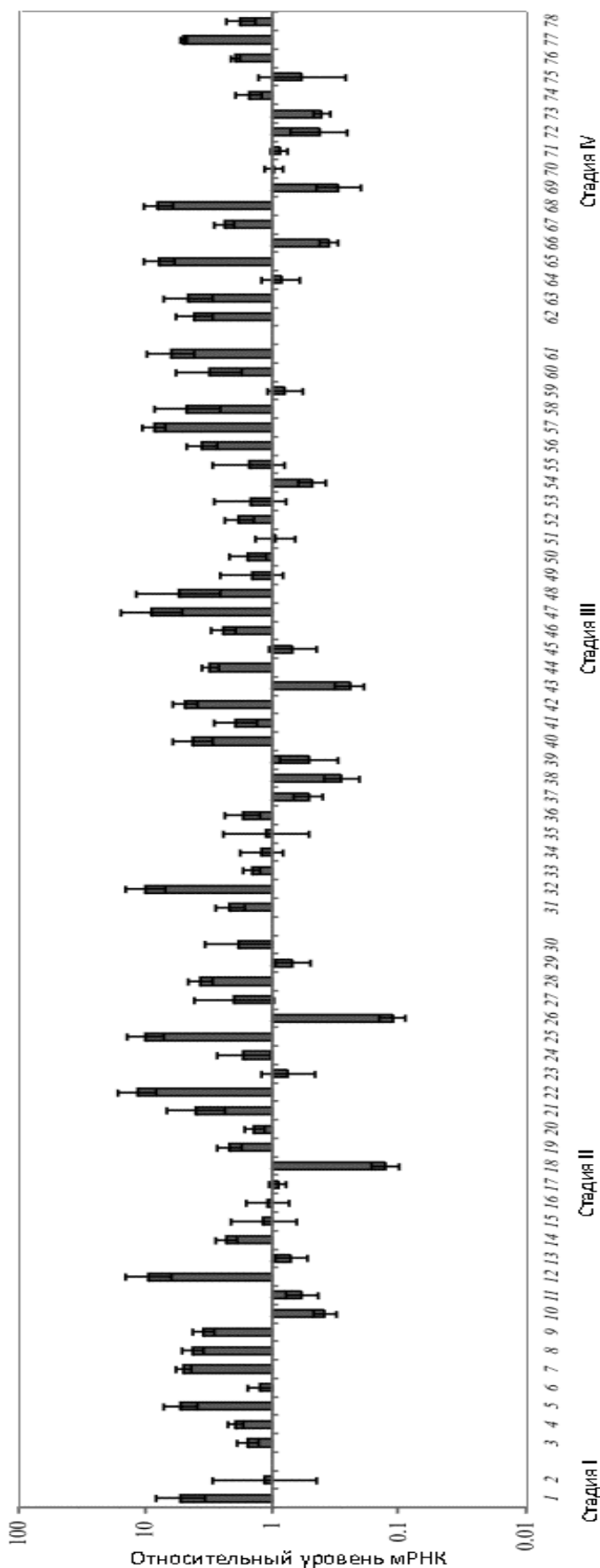


Рис. 5. Относительный уровень экспрессии гена *HK3* в образцах КРР.

Таким образом, результаты экспериментальной валидации методом количественной ПЦР подтвердили результаты проведенного нами биоинформатического анализа ресурса «TCGA» даже в тех случаях, когда они не согласовывались с данными литературы (как, например, в случае экспрессии гексокиназ при КРР).

Дополнительным результатом можно считать обнаружение высокой вариабельности базового уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты гликолиза. То есть уровень экспрессии этих генов в норме может сильно варьировать у разных индивидуумов. В образцах условной нормы исследуемой выборки он в значительной степени варьировал и оказался индивидуальной характеристикой. Таким образом, в случае дальнейшего использования уровня экспрессии рассматриваемых генов в клинической практике, от каждого больного необходимо получать образец нормальной ткани, который затем будет сопоставляться с тканью опухоли. Использование среднего значения для пула образцов нормальных тканей не является корректным.

Помимо основных ферментов гликолиза исследовали ген *OGDHL*, который кодирует

субъединицу оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса, участвующего в цикле трикарбоновых кислот и вовлеченного в индукцию апоптоза [23]. Обнаружено снижение экспрессии гена *OGDHL* в 50% (15/30) образцов КРР в среднем в 8 раз (рис. 6).

Для других нозологических категорий ЗНО также была проведена количественная ПЦР с целью валидации результатов биоинформатического анализа базы данных «TCGA» на российской выборке. Основные тренды подтвердились [13,51].

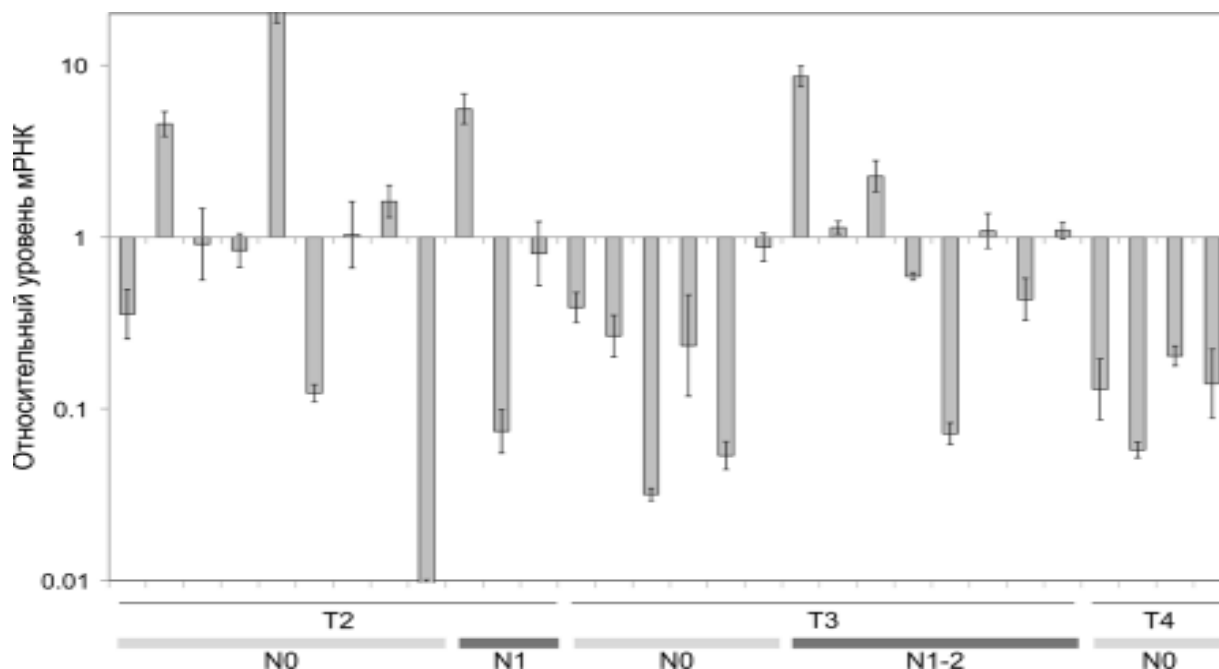


Рис. 6. Относительный уровень экспрессии гена *OGDHL* в образцах КРР.

С помощью метода количественной ПЦР в режиме реального времени нами проведена оценка уровня экспрессии генов, кодирующих основные ферменты гликолиза, при папиллярном раке почки и плоскоклеточном раке легкого (рис. 7) [13].

Было показано, что только часть генов, кодирующих ферменты гликолиза, сохраняет относительно стабильный уровень мРНК – *HK1*, *ADPGK*, *GPI*, *PGK1*, *PKM2* при папиллярном раке почки и *ADPGK*, *ALDOA*, *GAPDH*, *PGK1*, *BPGM*, *ENO1*, *PKM2* при плоскоклеточном раке легкого. Впервые методом кПЦР выявлено частое повышение экспрессии мРНК генов *PFKP*, *ALDOA* и *GAPDH* при раке почки, а также гена *GPI* при раке легкого. Для остальных генов обнаружены как случаи понижения, так и повышения уровня мРНК.

Для рака предстательной железы, на основе полученных результатов RNA-Seq анализа, была проведена оценка экспрессии ряда генов, вовлеченных в гликолиз и цикл трикарбоновых кислот, идентифицированных ранее с использованием данных «TCGA». Статистически значимые изменения экспрессии на выборке российских пациентов были подтверждены для генов *ALDH2*, *PGAM1*, *ADH1B*, *PFKP*, *PGM2*, *HK1*, *IDH1*, *ACSS1*,

HK2, OGDHL, PGK2, ALDOA, ALDH3B2, ACLY, ALDH1B1, GALM, ACO1, GCK, ALDH1A3, ENO2, ALDH3B1, PGM1, ACSS2, ADPGK и *MINPP1* (Таблицы 1 и 2).

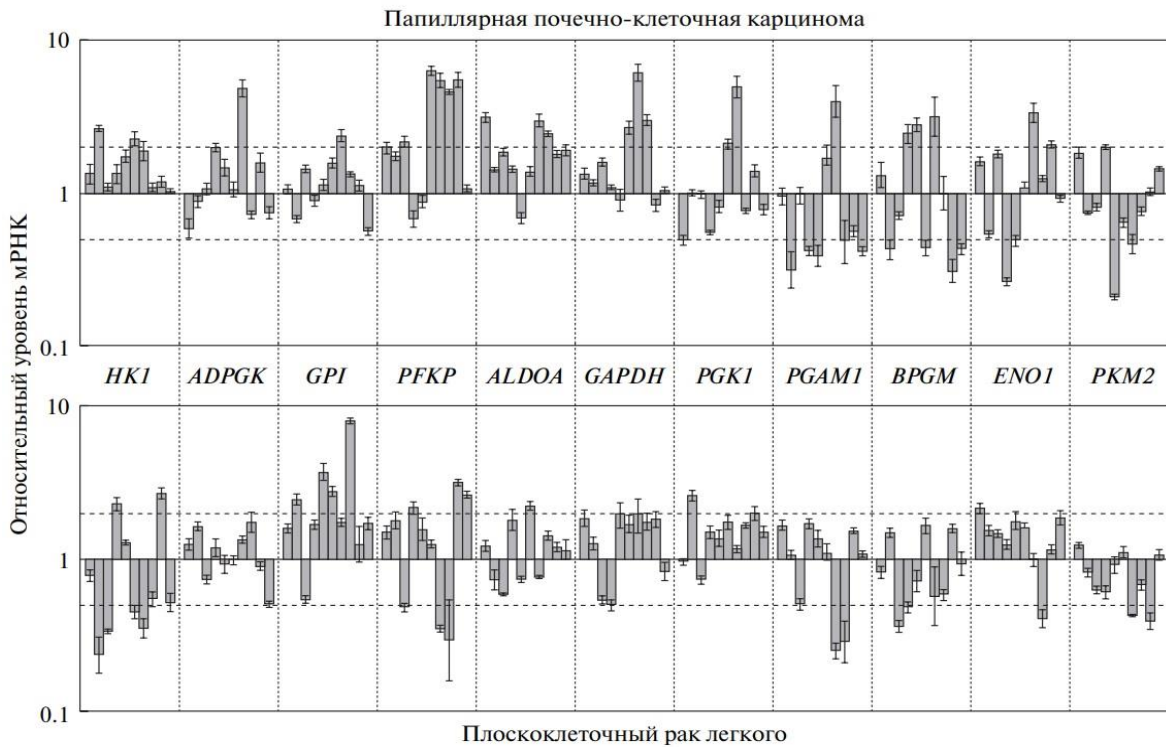


Рис. 7. Относительный уровень экспрессии генов в опухолях почки и легкого, определенный с помощью метода кПЦР. Пунктирными линиями отмечены изменения уровня мРНК в 2 раза.

Исследование методом количественной ПЦР также показало повышение (до 7 раз) уровня мРНК *HK2* в 35% (21 из 59, $P < 0,05$) образцов (рис.8) [40]. Понижение уровня мРНК (до 5 раз) *HK2* выявлено в 15% (9/59) случаев. Среднее значение относительного уровня мРНК составило 2,5.

Уровень мРНК *HK1* в большинстве образцов не изменялся (85%, 51/59). Понижение экспрессии *HK1* до 7 раз было обнаружено в 15% (9/59) образцов. Среднее значение относительного уровня мРНК составило 1,9. мРНК *HK3* экспрессировалась на очень низком уровне и не могла быть уверенно детектирована для получения корректных результатов количественной оценки. Между уровнями экспрессии генов *HK1* and *HK2* статистически значимой корреляции выявлено не было, Коэффициент корреляции Спирмена (r_s) составил 0,04.

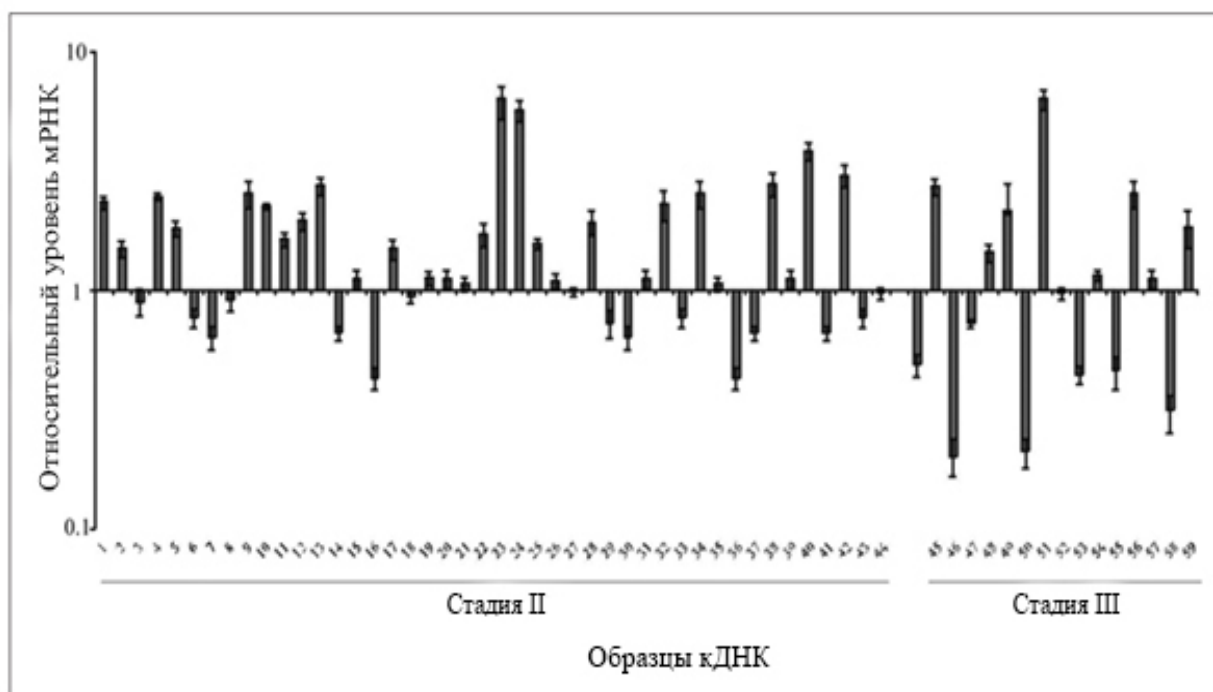


Рис. 8. Относительный уровень экспрессии гена *HK2* в образцах РПЖ.

Таблица 3. Относительное изменение уровня экспрессии генов, вовлеченных в гликолиз и цикл трикарбоновых кислот, при раке предстательной железы для выборки российских пациентов.

Ген	LogFC	P-value
<i>ALDH2</i>	-0,28	4,84E-02
<i>PGAM1</i>	-0,25	1,86E-02
<i>ADH1B</i>	-0,65	1,60E-02
<i>PFKF</i>	-0,41	1,43E-02
<i>PGM2</i>	0,32	1,43E-02
<i>HK1</i>	-0,37	9,77E-03
<i>IDH1</i>	0,41	9,20E-03
<i>ACSS1</i>	0,49	7,64E-03
<i>HK2</i>	0,54	6,44E-03
<i>OGDHL</i>	0,99	5,43E-03
<i>PGK2</i>	1,49	3,64E-03
<i>ALDOA</i>	-0,32	3,43E-03
<i>ALDH3B2</i>	1,24	2,01E-03
<i>ACLY</i>	0,52	1,46E-03
<i>ALDH1B1</i>	-0,51	6,05E-04
<i>GALM</i>	-0,49	4,57E-04
<i>ACO1</i>	-0,36	2,89E-04
<i>GCK</i>	-1,03	2,83E-04
<i>ALDH1A3</i>	0,79	1,84E-04
<i>ENO2</i>	-0,68	1,39E-04
<i>ALDH3B1</i>	-0,59	1,05E-04
<i>PGM1</i>	-0,41	9,62E-05
<i>ACSS2</i>	-0,38	2,94E-05
<i>ADPGK</i>	0,53	1,23E-05
<i>MINPP1</i>	0,9	7,23E-09

Таким образом, при раке предстательной железы было выявлено существенное повышение экспрессии гена *HK2*. Полученные результаты указывают на то, что ген *HK2* может быть вовлечен в нарушение энергетического метаболизма при данной нозологии.

3. Определение механизмов онко-ассоциированного изменения экспрессии некоторых генов, вовлеченных в энергетический обмен, при различных нозологических категориях ЗНО

При помощи программного пакета CrossHub [44] были проанализированы возможные механизмы активации экспрессии генов, связанных с метаболизмом глюкозы, в контексте анализа потенциальных механизмов регуляции экспрессии.

3.1. Регуляция экспрессии генов с участием транскрипционных факторов

На рисунке 9 приведены результаты анализа вовлеченности двух транскрипционных факторов, существенно активированных при КРР: «классического» онкогена Мус, а также фактора СВХ3, менее изученного в контексте участия в канцерогенезе, в регуляцию экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом глюкозы. Продемонстрировано распределение 430 генов в зависимости от вероятности связывания с транскрипционным фактором согласно данным ChIP-Seq в базе ENCODE; а также в зависимости от согласованности экспрессии гена интереса с экспрессией транскрипционного фактора. На рисунке 9 гены, для которых данные о связывании с ТФ отсутствуют, находятся на отметке 0. Размер круга определяется общим количеством ридов на ген. Цвет круга указывает на направленность изменения уровня экспрессии в опухоли – повышение или понижение.

Для каждой нозологической категории ЗНО список генов (участвующих в энергетическом обмене и его регуляции) с наибольшими изменениями уровня экспрессии отличается. При этом опухолевые клетки могут использовать самые различные молекулярные механизмы для контроля уровня экспрессии этих генов (*Snezhkina et al, BMC Med Genomics, 2018, 11(Suppl 1), 17*), [48], (*Snezhkina et al, Int J Mol Sci., 2020, 21, 6950*), [7, 13]. Для некоторых из них нами были детально исследованы вероятные причины, приводящие к нарушению экспрессии [8, 17, 23, 25, 26, 30, 45, 51, 55, 66, 70, 71].

Ассоциации с 430 генами, вовлечёнными в гликолиз

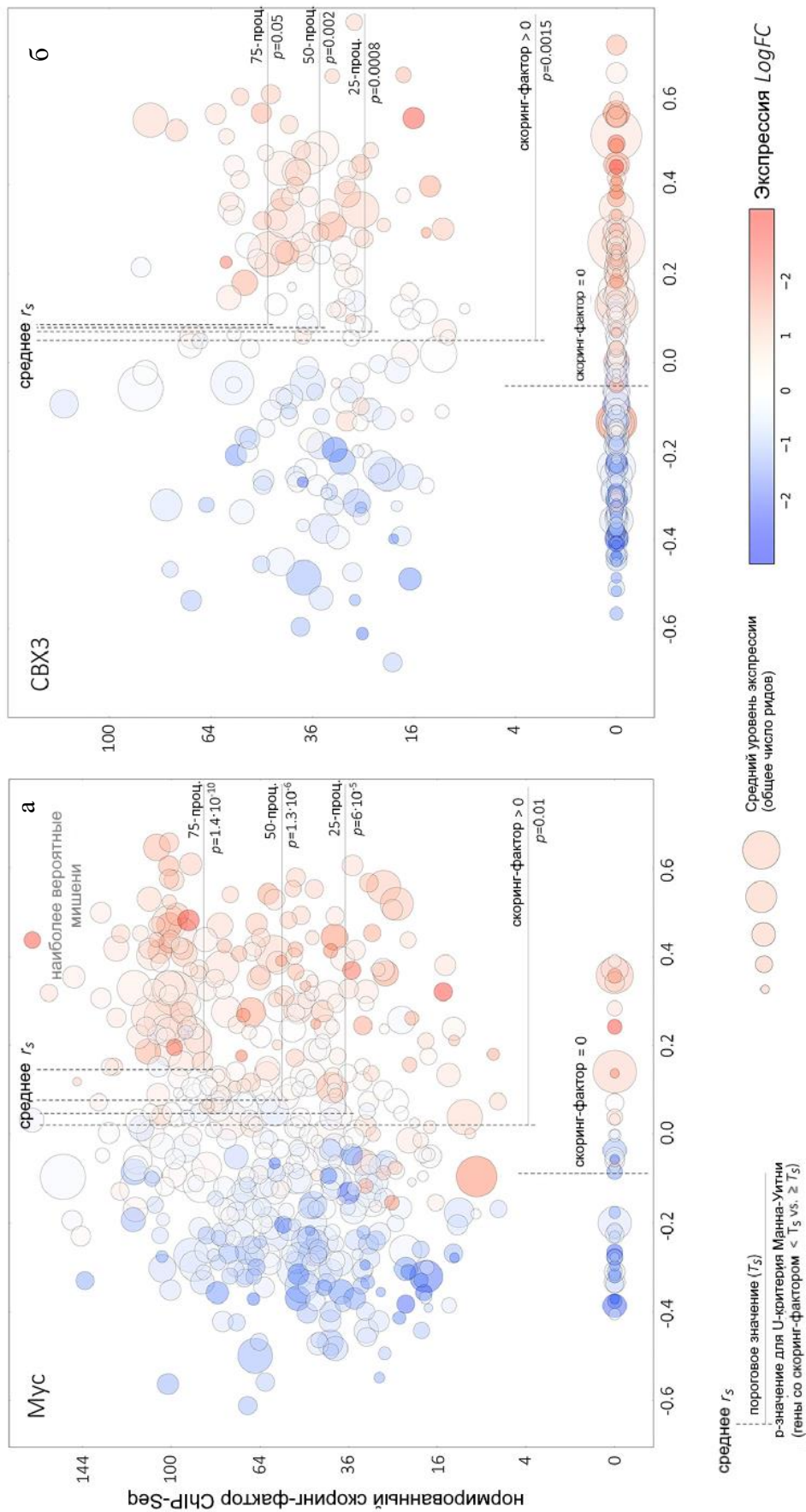


Рис. 9. Анализ участия транскрипционных факторов МУС и СВХ3 в регуляции экспрессии 430 генов, ассоциированных с метаболизмом глюкозы.

3.2. Регуляция экспрессии генов при помощи микроРНК

В опухолях колоректального рака наблюдается снижение экспрессии гена *HK2*, кодирующего один из ключевых ферментов, определяющих скорость гликолиза, поэтому изучение механизмов этого эффекта представляет особый интерес. С целью поиска микроРНК, предположительно способных ингибировать экспрессию гена *HK2* при КРР, с помощью программного пакета CrossHub выполнен анализ данных, представленных в «TCGA» и пяти базах по микроРНК-мРНК-взаимодействию (TargetScan, DIANA microT, mirSVR (miRanda), PicTar и miRTarBase). Для дальнейшей экспериментальной проверки были выбраны семь микроРНК, содержащих сайт связывания с мРНК гена *HK2*, и экспрессия которых демонстрирует обратную корреляцию с экспрессией *HK2*. Методом кПЦР оценили уровень экспрессии этих микроРНК и мРНК *HK2* в образцах колоректального рака российских пациентов. Было показано, что экспрессия трех микроРНК (miR-9-5p, -98-5p и -199-5p) повышается и коррелирует с уровнем мРНК *HK2*. Таким образом, снижение экспрессии гена *HK2* при КРР может быть обусловлено ее негативной регуляцией посредством микроРНК miR-9-5p, -98-5p и -199-5p [17].

3.3. Альтернативный сплайсинг как способ контроля экспрессии генов

Чтобы оценить распространенность альтернативного сплайсинга в процессах энергетического обмена, при помощи программного пакета CrossHub нами проанализированы транскриптомные данные опухолей КРР и прилежащих нормальных тканей, депонированных в ресурс «TCGA» [45]. Проведена оценка экспрессии 1014 альтернативных изоформ мРНК, вовлеченных в энергетический обмен. Обнаружено 7 генов с дифференциально экспрессирующимися альтернативными транскриптами, в то время как суммарная экспрессия этих генов в опухолях КРР существенно не изменялась. Результаты для 8-ми дифференциально экспрессирующихся транскриптов были валидированы методом кПЦР. Эти 8 изоформ, кодируемых генами *OGDH*, *COL6A3*, *ICAM1*, *PHPT1*, *PPP2R5D*, *SLC29A1* и *TRIB3*, демонстрировали в опухолях КРР повышение уровня мРНК, что полностью согласовывалось с результатами биоинформатического анализа. Было обнаружено, что уровень мРНК альтернативного транскрипта NM_057167, кодируемого геном *COL6A3*, также существенно повышается в опухолях РМЖ, РПЖ, РЛ и РП. Уровень мРНК альтернативного транскрипта гена *SLC29A1* (NM_001078177) оказался повышен специфично в опухолях КРР.

Таким образом, нами был идентифицирован набор альтернативных транскриптов 7-ми генов, вовлеченных в энергетический обмен при КРР, с опухолеспецифической экспрессией, что потенциально может быть использовано в клинической практике.

3.4. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов

Нарушение экспрессии генов в опухолях встречается очень часто, и механизмы, регулирующие эти процессы, могут быть самыми разнообразными, в том числе, эпигенетическими. Эпигенетическая регуляция реализуется несколькими путями, большинство из которых было обнаружено нами в процессе поиска причин нарушения экспрессии генов, вовлеченных в энергетический метаболизм опухолевых клеток [35, 39, 73,77] (*Senchenko et al, Epigenetics, 2013, 8. 409; Dmitriev et al, Epigenetics, 2012, 7. 502; Haraldson et al, Biochimie, 2012, 94, 1151; Cherkasova et al, Oncogene, 2011, 30, 4697; Komkov et al, Mobile DNA-UK, 2020, 11, 133*).

3.4.1. Регуляция за счет метилирования ДНК

Нами было показано, что энергетический метаболизм связан с уровнем метилирования генома при раке толстой кишки. При этой нозологии был описан так называемый метиляторный фенотип, когда большое количество генов одновременно подвергаются метилированию (СІМР-фенотип) [30]. Подобные нарушения встречаются в 15–20% злокачественных опухолей толстой кишки. Молекулярные механизмы этого феномена до сих пор не изучены детально. Существует два основных варианта классификации рака толстой кишки по степени метилирования генома. Один вариант делит опухоли на СІМР+ и СІМР-. Второй вариант выделяет 3 категории: СІМР-high, СІМР-low и non-СІМР (классификация Огіно с соавторами).

Формирование СІМР следует за глобальными изменениями экспрессии генов и нарушениями метаболизма. В частности, СІМР-low аденокарцинома толстой кишки, преимущественно принадлежащая к консенсусному молекулярному подтипу 3 (СМ53, «Metabolic»), ассоциирована с повышенной экспрессией генов, принимающих участие в метаболических путях.

Нами проведен биоинформатический анализ данных транскриптома (ресурс «TCGA»). Образцы аденокарциномы толстой кишки, характеризующиеся СІМР-high фенотипом, сравнили с образцами non-СІМР фенотипа при помощи программных пакетов DESeq2, clusterProfiler и topGO. Полученные результаты валидировали методом кПЦР на 40 образцах российских пациентов, используя ткани опухолей и условной нормы.

Было выявлено повышение экспрессии многих генов, вовлеченных в гликолиз и связанные с ним процессы (*ENO2, PFKF, HK3, PKM, ENO1, HK2, PGAM1, GAPDH, ALDOA, GPI, TPI1 и HK1*), в образцах с СІМР-high фенотипом по сравнению с non-СІМР. Интересно, что уровень мРНК гена пируваткиназы (*PKLR*), принимающей участие в глюконеогенезе, оказался сниженным примерно в 20 раз в образцах с СІМР-high фенотипом. Также было обнаружено понижение экспрессии (до 8 раз) гена *OGDHL*, вовлеченного в цикл трикарбоновых кислот.

Биоинформатический анализ данных проекта «TCGA» позволил сформулировать гипотезу, что основным механизмом инактивации гена *OGDHL* (кодирует субъединицу оксоглутарат-дегидрогеназного комплекса) является гиперметилование промотора (рис. 10), поэтому для образцов с наибольшим снижением уровня мРНК был выполнен анализ паттерна метилирования промоторной области гена *OGDHL*. С целью подбора праймеров для бисульфитного секвенирования, совместно с Г.С. Красновым и А.А. Дмитриевым, был разработан алгоритм, позволяющий анализировать протяженные участки регуляторных областей генов (*Krasnov et al, J Bioinform Comput Biol., 2018, 16, 1840004*). В ходе экспериментальной проверки на образцах российской популяции в промоторной области гена *OGDHL* нами выявлен участок (+327...+767 от старта транскрипции), часто подвергающийся гиперметилованию в образцах со сниженной экспрессией (80%, 8/10) и, вероятно, ответственный за инактивацию гена [23].

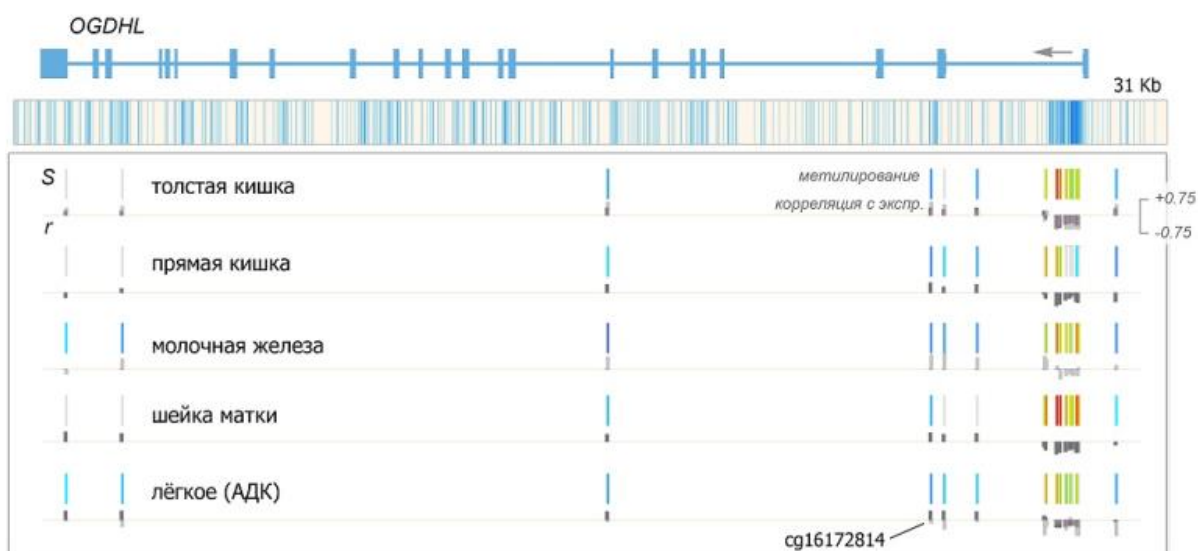


Рис. 10. Биоинформатический анализ сайтов метилирования в промоторном регионе гена *OGDHL*, вовлеченных в регуляцию экспрессии при различных ЗНО.

Таким образом, нами была выявлена ассоциация между CIMP-high статусом и изменениями энергетического метаболизма на транскриптомном уровне. Дифференциальное метилирование как минимум девяти CpG-сайтов промотора гена *OGDHL*, как и понижение уровня мРНК этого гена, потенциально может служить дополнительным маркером CIMP-high фенотипа при аденокарциноме толстой кишки.

Среди всех эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов метилирование ДНК является одним из наиболее перспективных с точки зрения внедрения в клиническую практику. Во-первых, ДНК лучше сохраняется в архивном материале и лучше выделяется, а во-вторых, во многих молекулярно-генетических лабораториях при онкологических учреждениях уже проводят тесты на метилирование (например, исследование метилирования промотора гена *MGMT*). Таким образом, метод отработан персоналом клиник и легко может быть масштабирован на другие гены. Метилирование ДНК вносило значимый вклад в инактивацию большинства генов,

которые были нами изучены при различных ЗНО [8, 26, 30, 55, 70], (*Senchenko et al, Epigenetics, 2013, 8, 409; Dmitriev et al, Epigenetics, 2012, 7, 502; Haraldson et al, Biochimie, 2012, 94, 1151; Krasnov et al, J Bioinform Comput Biol., 2018, 16, 1840004; Senchenko et al, PLoS One, 2011, 6, e15612; Сенченко и др., Медицинская генетика, 2012, 11, 45*). Более того, дифференциальное метилирование может помочь при прогнозировании течения заболевания, как нами было показано для РПЖ [39].

3.4.2. Регуляция за счет изменения конформации хроматина

В опухолях часто активируются гены, которые обладают узкой тканеспецифичностью, и в норме не характерны для данного типа ткани. Как правило, тканеспецифичная инактивация генов, как и экспрессия на определенном этапе онтогенеза, обеспечивается либо за счет изменения конформации хроматина, регулирующего доступность участка гена для транскрипции, либо за счет метилирования ДНК. Одним из таких примеров являются гены *SEMG1* и *SEMG2*, кодирующие семеногелины, в норме специфично экспрессирующиеся в мужских первичных половых клетках, но также обнаруженные в опухолях предстательной железы, почки, легкого и при гемабластозе.

Функциональная значимость повышенной экспрессии семеногелинов в малигнизированных клетках оставалась неизвестной. Совместно с лабораторией Н. А. Барлева нами было показано, что *SEMG1* и *SEMG2* экспрессируются в образцах рака легкого и в клеточных линиях, полученных из опухолей различного происхождения, при этом группа пациентов с наличием экспрессии этих генов имела более низкие показатели выживаемости.

Анализ преципитации белков с последующей LC-MS/MS масс-спектрометрией показал, что семеногелины ассоциированы с 119 белками, в числе которых два важнейших фермента метаболизма глюкозы, пируваткиназа М2 (PKM2) и лактатдегидрогеназа А (LDHA). Причем семеногелины провоцируют увеличение количества этих ферментов и их активность, а также рост митохондриального мембранного потенциала (ММР), активацию гликолиза, клеточного дыхания и образования активных форм кислорода в нескольких опухолевых клеточных линиях. Полученные данные дают основание предполагать, что семеногелины вовлечены в активацию энергетического метаболизма, по-видимому, вовлекаясь в процессы изменения конформации хроматина, что способствует процессу малигнизации и прогрессии заболевания [46].

Также нами было показано, что важную роль в обеспечении эпигенетической регуляции экспрессии генов играют горячие точки двунитевых разрывов ДНК и геномные контакты с рибосомальной ДНК человека [73].

3.4.3. Регуляция при помощи длинных некодирующих РНК

Еще одним распространенным эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии генов является действие молекул длинных некодирующих РНК [77].

В практической онкологии роль молекул этого класса особенно важна в формировании устойчивости к противоопухолевой терапии. Совместно с Д. С. Карповым, Н. А. Лисицыным и Т. Д. Машковой нами было показано, что экспрессия длинной некодирующей РНК LINC00973 повышается в нормальных и опухолевых клетках после обработки различными химиотерапевтическими агентами.

Биоинформатический анализ показал, что это происходит в связи с активацией пути ответа на повреждение ДНК или остановкой митоза. Нокдаун LINC0973 вызвал повышение уровня белка p21 (блокируя его деградацию), активацию пролиферации опухолевых клеток и подавление апоптоза обработанных препаратом клеток. Помимо этого, оверэкспрессия LINC00973 ингибирует образование изоформы p53-Ser15-P, которая предохраняет хромосомы от нарушения целостности.

4. Идентификация потенциальных прогностических и предиктивных маркеров, терапевтических мишеней, а также оценка их прикладного потенциала

4.1. Потенциальные онкомаркеры

Было сделано предположение, что гены, связанные с энергетическим обменом и его регуляцией, могут быть потенциальными молекулярно-генетическими маркерами, в первую очередь, прогностическими и предиктивными.

Рак молочной железы. При РМЖ была исследована экспрессия генов *HK1* и *HK2* [64]. Методом кПЦР проведена оценка уровня мРНК генов *HK1* и *HK2* в 15 парных образцах базальноподобного тройного негативного РМЖ и в 15 - люминального А подтипа. Выявлено значительное повышение экспрессии гена *HK2* в 73% (11/15, $p < 0,05$) исследуемых образцов тройного негативного РМЖ от 2 до 42 раз. В среднем уровень мРНК *HK2* повышался в 7,4 раза. При люминальном А РМЖ повышение экспрессии гена *HK2* обнаружено в 26% (4/15, $p < 0,05$) случаев, максимально до 7 раз. В среднем уровень мРНК гена *HK2* повышался в 2,9 раза.

Сходные данные (повышение экспрессии *HK2*) получены нами для пациентов с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Для этой группы в целом характерно более агрессивное течение РМЖ. Различный уровень мРНК гена *HK2* может быть объяснен отличиями в базовых механизмах патогенеза отдельных подтипов РМЖ, различающихся по клинической картине. Как следствие, повышение экспрессии этого гена можно рассматривать как косвенный маркер агрессивного течения РМЖ.

Рак предстательной железы. Прогрессия РПЖ, в большинстве случаев, не так стремительна, как для многих других нозологических категорий ЗНО. Наличие большого количества альтернатив при выборе тактики лечения остро ставит вопрос о поиске дополнительных молекулярных маркеров для ее обоснованного выбора.

Согласно предварительным результатам биоинформатического анализа данных консорциума «TCGA», имелись основания полагать, что при неблагоприятном прогнозе РПЖ гликолиз активирован в большей степени. Однако в базе данных ресурса «TCGA», имелось недостаточно данных об отдаленных результатах хирургического лечения. Более того, для материала, полученного из различных клиник, были обнаружены существенные различия как по качеству биоматериала, так и по количеству рецидивов для однотипных групп. Методами биоинформатики идентифицирован ряд маркеров, коррелирующих с безрецидивной выживаемостью местно-распространенного РПЖ [11]. Дальнейшие исследования были направлены на получение результатов на основе собственной выборки российских пациентов.

Чтобы оценить возможность использования генов, вовлеченных в энергетический обмен, в качестве маркеров, проведен транскриптомный анализ опухолевой ткани (NGS, Illumina) пациентов из российской популяции. Собрана уникальная гомогенная по характеристикам выборка местно-распространенного РПЖ группы высокого риска с лимфогенной диссеминацией и без нее. Пациенты оперированы одной школой хирургов и наблюдались после этого не менее трех лет. Рассматривали как совокупную выборку, так и наиболее распространенный подтип РПЖ - «TMPRSS2-ERG» [65]. Местно-распространенному РПЖ уделено особое внимание, так как именно на этой стадии развития заболевания возникает наибольшее количество острых вопросов, связанных с выбором тактики лечения.

На основе полученных данных RNA-Seq анализа для выборки российских пациентов с местно-распространенным РПЖ, была проведена оценка экспрессии генов, вовлеченных в энергетический обмен. Особенности экспрессии генов были рассмотрены в соответствии с наличием TMPRSS2-ERG транскрипта, лимфогенной диссеминацией, а также при наличии неблагоприятного прогноза (послеоперационный биохимический рецидив). В таблице 4 представлены статистически значимые результаты дифференциальной экспрессии генов в случае каждого сравнения.

Было отмечено повышение экспрессии гена *OGDHL* более чем в 2,5 раза как при неблагоприятном прогнозе, так и при наличии TMPRSS2-ERG транскрипта. Стоит также отметить, что по данным TCGA экспрессия гена *OGDHL* также значимо повышается в случае наличия TMPRSS2-ERG транскрипта в 6,54 раза ($\text{LogFC} = 2.71$; $\text{P-value} = 7,88\text{E-}21$).

В группе с лимфогенной диссеминацией выявлено понижение экспрессии генов, вовлеченных в путь «Регуляция липолиза в адипоцитах». Выявлены перспективные прогностические маркеры лимфогенной диссеминации на уровне мРНК - *PCAT4*, *VGLL3*, *TBX1*, *OCNL*, *CST2*, *F5*, *RAB27A*. Результаты высокопроизводительного секвенирования были валидированы методом кПЦР на дополнительной независимой выборке образцов местно-распространенного РПЖ российских пациентов, в ходе которой результаты подтвердились для генов *CST2*, *OCNL*, *PCAT4*.

Таблица 4. Результаты анализа дифференциальной экспрессии генов, вовлеченных в энергетический обмен, для выборки российских пациентов с местно-распространенным РПЖ.

Ген	Биохимический рецидив		Лимфогенная диссеминация		Наличие TMPRSS2-ERG транскрипта	
	LogFC	P-value	LogFC	P-value	LogFC	P-value
<i>G6PC</i>	-1,94	3,18E-02				
<i>ADH1B</i>					-0,64	2,87E-02
<i>GALM</i>					-0,51	9,34E-04
<i>GCK</i>					-0,53	3,12E-02
<i>LDHAL6B</i>	1,06	3,71E-02				
<i>ADH5</i>					-0,34	8,13E-04
<i>ALDH2</i>			-0,54	1,66E-03	-0,55	4,41E-04
<i>LDHA</i>			0,24	4,78E-02		
<i>ALDH3B1</i>					-0,4	1,94E-03
<i>ADPGK</i>	-0,61	7,95E-03				
<i>ALDH1A3</i>			-0,54	1,73E-02		
<i>GPI</i>			0,27	2,47E-03		
<i>ENO1</i>			0,39	2,03E-04		
<i>ALDOC</i>	-0,66	2,55E-02				
<i>PGK2</i>					0,98	4,67E-02
<i>ADH7</i>			7,17	4,05E-09	-8,68	1,12E-09
<i>ADH4</i>					-1,17	3,66E-03
<i>ENO2</i>					-0,44	2,80E-03
<i>ALDOA</i>	-0,31	4,85E-02				
<i>PDHAI</i>			0,25	5,09E-04	0,2	8,66E-03
<i>MINPP1</i>			-0,46	2,59E-03		
<i>SDHD</i>			-0,41	3,21E-02		
<i>SUCLA2</i>			-0,24	3,37E-02		
<i>MDH2</i>			0,24	1,44E-02		
<i>OGDHL</i>	1,8	4,37E-03			1,46	2,68E-04

Аналогичное исследование проведено для описанной выборки российских пациентов на уровне микроРНК. Выявлены перспективные прогностические маркеры лимфогенной диссеминации - miR-93-5p, miR-221-3p, miR-148a-3p и miR-615-3p. В процессе валидации методом кПЦР результаты подтвердились для miR-148a-3p и miR-615-3p [65]. Однако оказалось, что наиболее высоким прогностическим потенциалом для выявления лимфогенной диссеминации обладает комбинация маркеров на основе экспрессии генов *PCAT4+OCLN* и экспрессии микроРНК miR-148a-3p+miR-615-3p.

Внутри группы образцов без лимфогенной диссеминации сравнивали также группы с рецидивом и без него [67, 68]. Для молекулярного подтипа «TMPRSS2-ERG» маркерами неблагоприятного прогноза оказались: изменение экспрессии генов *ALDH3A2*, *CCNL2*, *CHKA*, *ODF2*, *QSOX2* и микроРНК has-miR-200b-3p, hsa-miR-503-5p (данные секвенирования транскрипта и микроРНК); изменения метилирования CGI CpG:29 (*HOXD4*), CpG:24 (*FAM20C*) и промотора ENSR00001220138 (*НСК*) (данные секвенирования метилома). Валидация методом кПЦР подтвердила достоверное изменение экспрессии генов *ALDH3A2*, *ODF2*, *QSOX2* и микроРНК has-miR-200b-3p, hsa-miR-503-5p для группы неблагоприятного прогноза [39, 40].

При этом наиболее перспективной моделью для прогнозирования рецидива местно-распространенного РПЖ в пределах подтипа «TMPRSS2-ERG» оказалась комбинация потенциальных маркеров *ALDH3A2 + ODF2 + QSOX2 + hsa-miR-503-5p +*

ISUP + pT. Экспрессия слитого транскрипта TMPRSS2-ERG, как самостоятельного признака, не продемонстрировала в наших исследованиях корреляции как с неблагоприятным прогнозом, так и с клинико-патологическими характеристиками при местно-распространенном РПЖ. Однако его экспрессия определяет специфический паттерн молекулярно-генетических особенностей, отличающих этот подтип от других: повышение экспрессии генов (*AMPD3*, *DACT2*, *ERG*, *PTK6*, *TLE1* и *WNK2*), днРНК (AL354984.2 и LINC02418) и микроРНК (*hsa-miR-200a-5p*, *hsa-miR-200b-5p* и *hsa-miR-429*), а также гиперметилирование (ENSR00001707736 и GH11J010579) и гипометилирование (ENSR00000029405) промоторов генов *GABBR1*, *IRAG1*, *IRAG1-AS1*, *LYVE1*, *PALD1*.

Помимо местно-распространенного РПЖ были исследованы образцы локализованного рака. Основной задачей было найти дополнительные параметры, которые можно было бы использовать для более дробной стратификации по риску. Было показано, что одним из таких параметров может быть уровень экспрессии гена *ENO1*, кодирующего фермент гликолиза енолазу. Необходимость поиска новых маркеров остро чувствуется и для метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (КРПЖ). На этой стадии образцы первичной опухоли недоступны для исследования, поэтому работа была сконцентрирована на изучении молекулярно-генетических особенностей экзосом крови. Наиболее значимым вопросом является точная идентификация начала прогрессирования заболевания на фоне применяемой терапии, так как ее своевременная смена на противоопухолевый препарат другого класса может существенно продлить жизнь пациента. Нами было проведено профилирование микроРНК экзосом плазмы крови пациентов в динамике, на фоне проводимого противоопухолевого лечения. Идентифицированы основные микроРНК, ассоциированные с началом прогрессирования КРПЖ: *miR-148b-3p*, *-148a-3p*, *-23a-3p*, *-7g-5p*, *let-7f-5p*, *-152-3p*, *-27a-3p*, *-378a-3p*, *-143-3p*, *-30e-3p*, *-125b-2-3p*, *-1-3p*, *-100-5p*, *-375-3p*, *-126-3p*, *-744-5p*, *-423-5p*, *-122-5p*, *-1307-3p*, *-320a-3p*. Для *miR-148a-3p* результаты подтверждены методом кПЦР [69].

КРР. Было сделано предположение, что уровень экспрессии *HK3* связан с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), и, следовательно, может быть потенциальным прогностическим маркером КРР [66]. Методом количественной ПЦР нами продемонстрировано, что экспрессия гена *HK3* коррелирует с уровнем мРНК ряда транскрипционных факторов, играющих ключевую роль в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (*ZEB2*, *TGFB3*, *TGFB1*, *SNAI2*, и *TWIST1*), а также двух других его участников (*GREM1* и *COL1A1*). Совокупность полученных результатов позволяет сделать предположение, что *HK3* напрямую или косвенно вовлечена в процесс эпителиально-мезенхимального перехода, а усиление экспрессии *HK3*, вероятно, является важным изменением, необходимым при адаптации метаболизма глюкозы в опухолевых клетках к процессу ЭМП при КРР. То есть это может быть важным

механизмом адаптации метаболизма к быстрой пролиферации, выживанию и метастазированию. *НК3* может быть маркером неблагоприятного прогноза при КРР, каковым, по мнению ряда авторов, является сам факт ЭМП [66].

В ходе нашей работы было также обнаружено, что процесс эпителиально-мезенхимального перехода, определяемый по экспрессии вовлеченных в него генов, слабо коррелирует с уровнем мРНК гена *NETO2* [29]. Этот ген известен, главным образом, по его участию в нейрон-специфических процессах, однако нами было обнаружено, что экспрессия *NETO2* повышается в ЗНО нескольких нозологий [12, 31]. В опухолях КРР повышение экспрессии этого гена ассоциировано с прогрессией, инвазией и метастазированием, однако существенной взаимосвязи с ЭМП выявить не удалось. Таким образом, *NETO2* может быть вовлечен в прогрессию КРР, однако это не ассоциировано напрямую с ЭМП [29]. Было показано, что одним из основных механизмов активации этого гена может быть взаимодействие с транскрипционным фактором *SAP30* [18]. Этот ген был подробно исследован в связи с тем, что он является каинатным рецептором. Согласно последним данным, эти рецепторы вовлечены в гомеостаз глюкозы. Интересно, что нокаут каинатных рецепторов позволяет избежать снижения гомеостаза глюкозы, которое особенно часто наблюдается в ходе старения организма (*Abarkan et al, Mol Metab., 2019, 30, 152*). Помимо *NETO2* нами был выявлен ещё ряд маркеров, которые подробно описаны в серии публикаций [1, 9, 10, 80-83] (*Краснов и др., Молекулярная биология, 2017, 51, 849*).

Таким образом, после дополнительных исследований на широких выборках образцов, гены, вовлеченные в энергетический обмен, имеют перспективы стать прогностическими маркерами, в частности, гексокиназы при РМЖ и КРР, и включаться в состав диагностических панелей, увеличивающих предсказательную силу по сравнению с индивидуальным маркером.

4.2. Потенциальные противоопухолевые мишени

Помимо потенциальных онкомаркеров, среди участников энергетического обмена проведен поиск возможных терапевтических мишеней, некоторые из них подробно описаны нами в обзорных статьях [36, 42, 43]. Наиболее многообещающими кажутся мишени, которые могли бы быть применимы для максимально широкого спектра нозологий. Одной из таких перспективных мишеней можно считать гексокиназу 2. Она активируется в большинстве исследованных нами нозологических форм ЗНО. Однако в образцах колоректального рака экспрессия *НК2* существенно слабее. Ранее мы показали, что в определенной категории образцов КРР (10-15%) все-таки наблюдается активация гена *НК2* [7]. Чаще всего такие образцы обладают также повышенным уровнем метилирования генома. Для этой категории целесообразно проверить применимость анти-*НК2*-терапии, которая могла бы быть использована в будущем, когда появятся специфичные средства доставки лекарств к клеткам-мишеням.

Результаты эксперимента по подавлению экспрессии гексокиназы 2 на модели КРР приведены в работе Федоровой с соавторами [22].

С использованием лентивирусного вектора нами была модифицирована клеточная линия RKO, в которой постоянно экспрессировались короткие шпилечные РНК для ингибирования гексокиназы 2 (рис.11). Был проведен количественный анализ экспрессии 15 генов, кодирующих ключевые ферменты гликолиза, а также гена *HIF1A*.

Выявлено значительное снижение экспрессии генов *PFKP*, *BPGM* и *GPI* на уровне мРНК (в 5, 86 и 93 раза, соответственно) и белка (в 2,5, 3,5 и 19 раз, соответственно). Снижение экспрессии этих генов может быть связано с уменьшением содержания субстрата первой реакции, катализируемой гексокиназами [22]. Таким образом, получены данные об изменении экспрессии генов при экспериментальном подавлении фермента гликолиза, наиболее часто активирующегося в опухолях различных локализаций, гексокиназы 2, на модели КРР. Такие данные необходимы для понимания результатов и последствий воздействия на ту или иную молекулу, рассматриваемую в качестве мишени при разработке способов таргетной терапии онкологических заболеваний.

По-видимому, клетки быстро адаптируются к нарушениям функционирования компонентов энергетического обмена. Для получения терапевтического эффекта необходимо инактивировать сразу несколько генов. Помимо этого, использование любых потенциальных мишеней, которые экспрессируются в широком спектре клеток организма, влечет необходимость разработки точных адресных систем доставки нацеленных на них лекарственных препаратов.

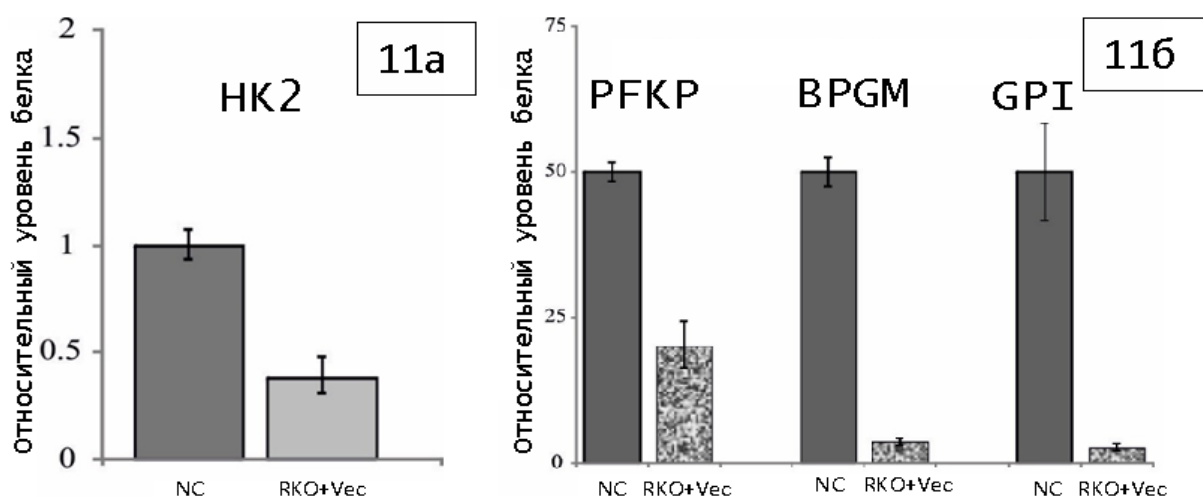


Рис. 11. (а) Уровень экспрессии НК2 в клеточной линии RKO после введения лентивирусного вектора, содержащего shRNA. NC – отрицательный контроль; Vec – лентивирусный вектор pLSLP, содержащий shRNA. $P < 0,05$. (б) Уровень экспрессии PFKP, GPI и BPGM в клеточной линии RKO с подавленной экспрессией гена НК2.

Однако на метаболические процессы могут воздействовать не только таргетные препараты. Совместно с коллегами мы исследовали воздействие широкого спектра химиотерапевтических препаратов на экспрессию генов, кодирующих основные ферменты метаболизма альдегидов, в клеточных линиях КРР [78].

Нами было показано, что содержание мРНК гена *AKR1B10* в сыворотке может быть потенциальным маркером для серологической диагностики КРР, так как оно значительно снижено у больных по сравнению со здоровыми донорами ($p < 0.0001$, SPE=92.9%, SNE=79.3%, AUC=0.889). Мы также обнаружили, что белок ALDH1A3, ключевой инактиватор ROS-образующих альдегидов, является перспективной мишенью для разработки новых противоопухолевых препаратов [78]. Работы проводились и в области тераностики - разработаны sgc8-ДНК-дендримеры для доставки противоопухолевых препаратов, в частности, доксорубицина [54].

5. Проверка гипотезы о взаимосвязи между активацией гликолиза, гиперметилированием генома, а также рядом драйверных мутаций

В последнее время появляется все больше работ, демонстрирующих взаимосвязь нарушения энергетического обмена и формирования так называемого CIMP+ фенотипа (CpG Island Methylator Phenotype) в нескольких видах злокачественных новообразований. Хотя впервые CIMP+ фенотип был идентифицирован и наиболее детально описан для КРР, этот термин используют для описания множественного метилирования CpG-островков в промоторных областях и при других типах опухолей. Считается, что CIMP+ фенотип связан с большей агрессивностью и худшим прогнозом, как минимум, при КРР. Чтобы проверить наличие такой ассоциации для частых видов злокачественных опухолей, был проведен биоинформатический анализ базы «TCGA».

Для образцов КРР указание на принадлежность к CIMP+ фенотипу можно найти в аннотации к образцам. Для других локализаций таких данных нет, поэтому первым этапом была разработка биоинформатического алгоритма идентификации групп опухолей с гиперметилированием генома на основе данных высокопроизводительного секвенирования при КРР, РПЖ, РМЖ, РЛ, РП. То есть нужно было найти способ разделения образцов на две группы согласно плотности метилирования, для последующего сопоставления их транскриптомных данных. Использовали данные 450K Aassay (Illumina).

Разработан и проанализирован ряд критериев отбора CIMP-опухолей, основанных на оценке глобальных изменений опухолевого метилома. Такой подход оказывается значительно точнее и информативнее методов идентификации CIMP-фенотипа, основанных на анализе профилей метилирования отдельных генов. Он может быть относительно легко расширен для идентификации CIMP-подобных опухолей и других локализаций. Для разработки критериев и оценки их информативности нами использованы данные ресурса «TCGA», а именно результаты оценки степени

метилирования около 300 тыс. CpG сайтов генома человека (микрочипы Infinium Human Methylation 450K BeadChip; 297 образцов РТК и 38 образцов прилежащих нормальных тканей), данные по соматическим мутациям (экзомное секвенирование; 272 образца КРР), данные по экспрессии генов (RNA-Seq; 287 образцов РТК и 41 образец прилежащей нормальной ткани). Анализ данных проведен с использованием модификаций приграммного пакета CrossHub [44].

На первом этапе анализа нами выделены CpG-сайты, относящиеся к промоторным и/или энхансерным областям. Для этого использованы данные ENCODE по предсказанию роли различных сегментов генома в 6 клеточных линиях: HUVEC, GM12878, H1-hESC, HeLa-S3, HepG2, K562 – полученные на основе анализа профилей модификаций гистонов и сайтов посадки транскрипционных факторов методом ChIP-Seq. В отдельные группы выделены CpG-сайты по следующим признакам: а) аннотированы как промотор, как минимум, в 3 из 6 клеточных линий (далее – «3xProm»; всего 95 тыс. из 300 тыс. сайтов); б) аннотированы как энхансер, как минимум, в 2 из 6 клеточных линий (далее – «2xEnh»; всего 36 тыс. из 300 тыс. сайтов).

На втором этапе для каждого CpG-сайта из выделенных групп рассчитаны скоринги: а) общий скоринг гиперметилирования (HyperMeth), отражающий насколько часто и интенсивно подвержен гиперметилированию в опухоли данный сайт: чем выше уровень метилирования сайта в опухоли, тем выше скоринг; б) скоринг гипометилирования (HypoMeth); в) скоринги дифференциального гипер- и гипометилирования: чем выше стандартное отклонение (StDev) уровней метилирования сайта в опухоли и чем выше StDev различий между нормой и опухолью для парных образцов, тем выше скоринги (DiffMeth.v1/v2/v3). Построено распределение величин скорингов и отобраны сайты, входящие в топ 1% и топ 10%. Таким образом, сформирован ряд выборок CpG-сайтов, относящихся к промоторам или энхансерам, и входящих в топ 1% или 10% гипер-, гипо- или дифференциально метилируемых в опухоли по сравнению с прилежащей нормой (около 40 выборок).

Далее, в рамках каждой группы CpG-сайтов для каждого анализируемого опухолевого образца РТК (TCGA) построено распределение уровней метилирования (beta-value) и отмечена медиана этого распределения («50 perc»), а также среднее значение между 80, 85, 90 и 95-м перцентилями («80,85,90,95 perc»). Полученные численные значения далее анализировались на пригодность в качестве маркеров CIMP+ фенотипа.

На рисунке 12а приведён пример распределения 297 образцов РТК из TCGA по маркеру «2xProm / DiffMeth.v2 / top.10 / 50 perc», т.е. 50-му перцентилю (медиане) значений beta-value среди CpG сайтов, которые входят в топ 10% дифференциально метилируемых сайтов, аннотированных в качестве промотора, как минимум в 2 из 6 клеточных линий ENCODE. Образцы с высокими численными значениями такого маркера являются CIMP-кандидатами. На рисунке 12б представлен другой пример

величины маркера «3xEnh / - / - / 50 perc», отражающего медиану уровня метилирования CpG-сайтов, аннотированных как энхансерные, минимум, в 3 из 6 клеточных линиях ENCODE, вне зависимости от скоринга гипер-/гипо- или дифференциального метилирования. Видно скачкообразное изменение первой производной в области 245-го образца, что может являться точкой условного разделения опухолей РТК на СІМР+/СІМР-негативные.

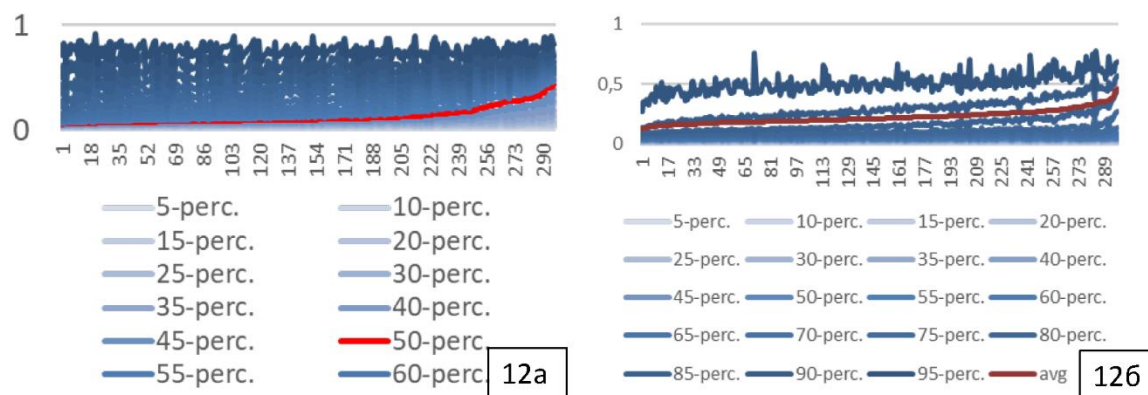


Рис. 12. Метилирование промоторов (12а) и энхансеров (12б).

В результате проведенных исследований для РПЖ, РМЖ, РЛ и РП выбраны параметры, позволяющие сформировать группу образцов, характеризующихся гиперметилированием генома. Это позволило сформулировать следующую задачу – провести оценку ассоциаций между нарушением энергетического обмена и наличием фенотипа, связанного с множественным метилированием генома, а также наличием драйверных мутаций в ряде генов. Поскольку наиболее ярко фенотип с повышенной плотностью метилирования генома был открыт именно при КРР, анализ был начат именно с этой нозологической категории ЗНО.

В ресурсе «TCGA» образцы аннотированы как СІМР+ и СІМР-. Однако существует и другая классификации, согласно которой выделяют три градации уровня метилирования генома: СІМР-high, СІМР-low и non-СІМР.

Нами было проведено и опубликовано исследование, демонстрирующее, что СІМР-high фенотип ассоциирован с изменением энергетического обмена при раке толстой кишки [38]. СІМР фенотип обнаружен в 15-20% случаев КРР и ассоциирован с глобальным изменением экспрессии генов и метаболическими нарушениями. В частности, СІМР-low рак толстой кишки преимущественно соответствует молекулярному подтипу 3 CMS-классификации (CMS3, "Metabolic") и ассоциирован с усилением экспрессии генов, принимающих участие в метаболических путях.

Проведен биоинформатический анализ RNA-Seq данных ресурса “TCGA” для СІМР-high и non-СІМР образцов рака толстой кишки при помощи пакетов DESeq2, clusterProfiler и topGO. Результаты представлены на рисунках 13 и 14. Полученные результаты валидированы на выборке образцов опухолей и прилежащих морфологически нормальных тканей методом количественной ПЦР. В СІМР-high

опухолях было выявлено повышение уровня экспрессии генов, вовлеченных в гликолиз и связанные с ним процессы (*ENO2*, *PFKP*, *HK3*, *PKM*, *ENO1*, *HK2*, *PGAM1*, *GAPDH*, *ALDOA*, *GPI*, *TP11* и *HK1*), по сравнению с non-CIMP опухолями. Наиболее интересный результат – снижение уровня экспрессии гена *PKLR*, кодирующего пируваткиназу, принимающую участие в глюконеогенезе, до 20 раз. До 8 раз снижалась экспрессия гена *OGDHL*, вовлеченного в цикл трикарбоновых кислот, в CIMP-high опухолях. При помощи количественной ПЦР мы подтвердили повышение экспрессии гена *ENO2* и снижение экспрессии гена *OGDHL* на выборке образцов рака толстой кишки.

Таким образом, мы продемонстрировали ассоциацию между CIMP-high статусом и изменениями энергетического обмена на транскриптомном уровне в образцах КРР. Дифференциальное метилирование как минимум 9 CpG сайтов в промоторном регионе гена *OGDHL*, как и снижение экспрессии мРНК этого гена, может служить потенциальным биомаркером CIMP-high статуса при раке толстой кишки. Аналогичные результаты получены для РПЖ, РМЖ, РЛ (ПКРЛ и АК), РП (СРП и ПРП).

В целом, биоинформатический анализ позволяет сделать вывод, что для ряда нозологических форм (как минимум, КРР и РПЖ) гиперметилирование генома ассоциировано с активацией гликолиза. Интересно, что ген *OGDHL*, идентифицированный нами ранее как регулируемый посредством метилирования промотора, оказался маркером CIMP+ фенотипа при КРР.

6. Оценка роли драйверных мутаций в формировании CIMP+ фенотипа опухолей

Существует ряд гипотез, объясняющих возникновение CIMP+ фенотипа в различных видах рака. В первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что определенные соматические мутации имеют высокий коэффициент корреляции с наличием CIMP+ фенотипа в некоторых опухолях. Это дает основание предполагать, что эти два явления представляют собой следствие единого процесса. Наиболее известные примеры - корреляция между наличием CIMP+ фенотипа и инактивацией гена «мисмэтч-репарации» *MLH1* при КРР, а также между наличием мутаций в генах *IDH1*, *IDH2* и кодирующих гистоны генов, таких как *H3F3A*, при глиобластоме, и мутациями в гене *TET2* при лейкемии.

По нашим данным, в TCGA 60% гипермутантных опухолей содержат мутации в гене системы репарации *MLH1* (что и является традиционным маркером микросателлитной нестабильности), наряду с высокой частотой активирующих мутаций в *BRAF* (V600E), повышенным общим мутационным фоном.

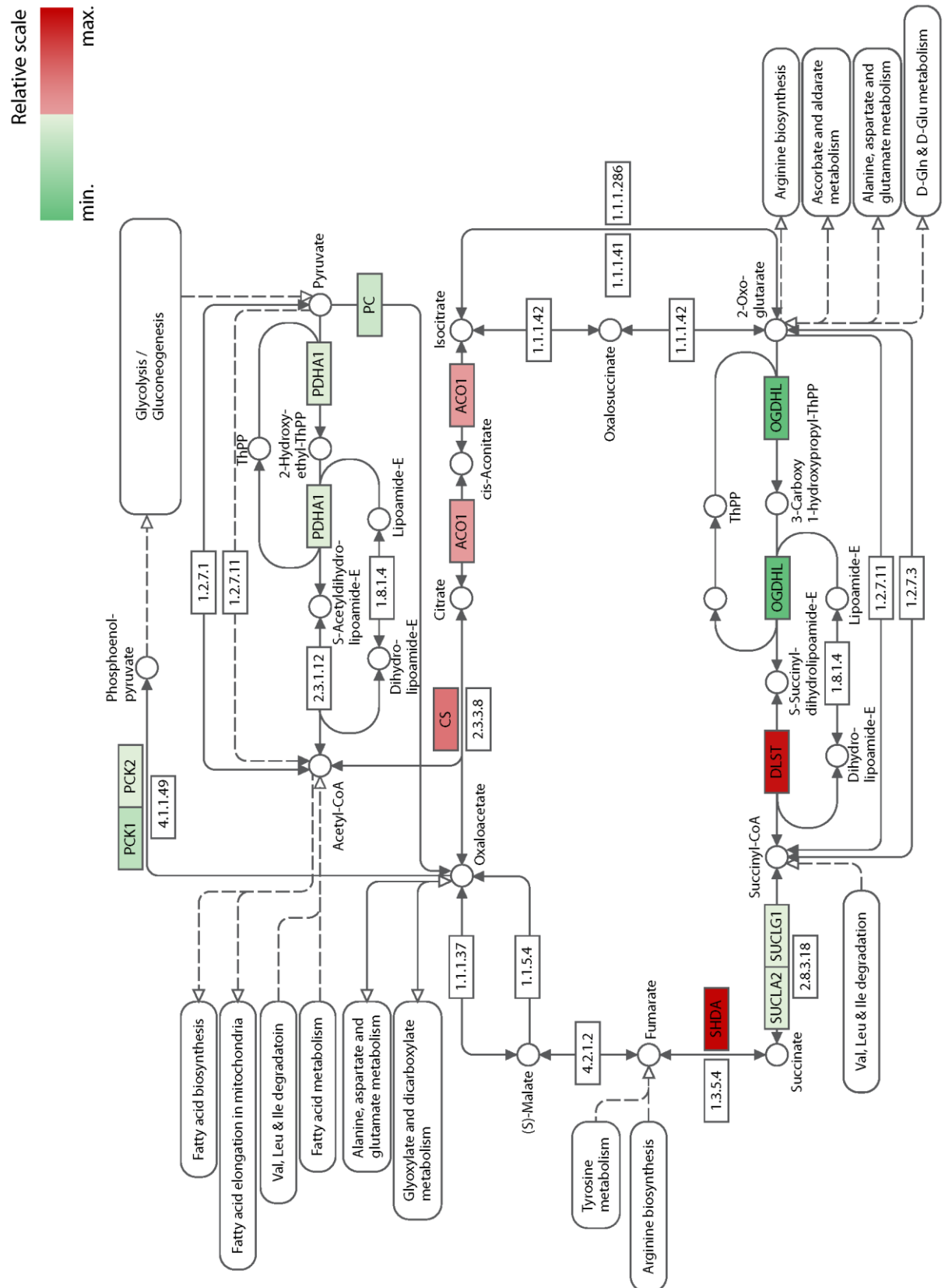


Рис. 13. Нарушения экспрессии генов, участников цикла Кребса пир КРР. Анализ данных «TCGA», сравнение SIMP+ и SIMP- образцов.

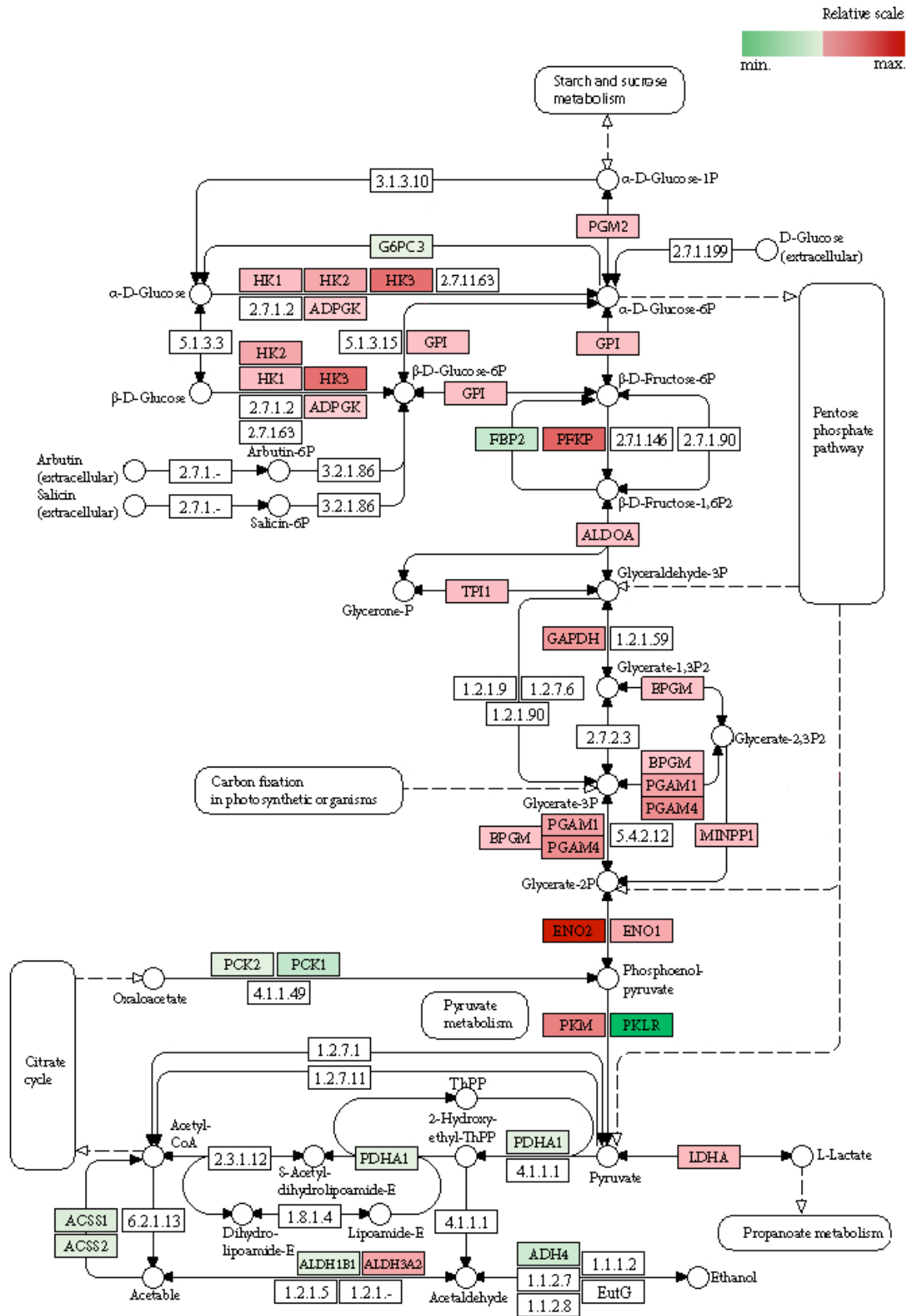


Рис. 14. Нарушения экспрессии генов, участников гликолиза при КРР. Анализ данных «TCGA», сравнение SIMP+ и SIMP- образцов.

Мутации в *MLH1* редко встречаются синхронно с мутациями в *APC* и *KRAS*. Таким образом, адекватный критерий отбора CIMP-опухоли толстой кишки должен проявлять:

1. Обратную корреляцию с мутациями в опухолевом супрессоре *APC*.
2. Прямую корреляцию с мутациями в *BRAF*.
3. Прямую корреляцию с общим мутационным фоном.
4. Высокие абсолютные значения коэффициентов корреляции с другими драйверами рака толстой кишки, такими как *RNF43*, *TP53*, *MUC6*, *ARID1A*.

Мутационный статус может быть также использован в качестве дополнительного фактора при формировании группы гиперметилированных образцов (например, в случае попадания в «серую зону»).

Полученные обширные данные о генах, вовлеченных в энергетический метаболизм опухолевых клеток и его регуляцию, однако, так и не позволили ответить на вопрос о том, в чем принципиальное отличие в патогенезе колоректального рака, которое обеспечивает быструю пролиферацию опухолевых клеток при минимальной или даже отсутствующей активации гликолиза.

Для ответа на этот вопрос нами были проведены детальные исследования ранних этапов патогенеза КРР. В результате был опубликован детальный анализ молекулярных маркеров КРР, которые во многих случаях отражают этапы и механизмы развития опухолей этой нозологической категории [47]. Нами также было проведено исследование кишечной микробиоты больных КРР - той среды, которая, по-видимому, играет ведущую роль в инициации болезни. Результаты будут рассмотрены ниже.

7. Оценка роли микробиоты в патогенезе рака толстой кишки и особенности энергетического обмена опухолевых клеток

Современные молекулярно-генетические методы позволяют все более детально расшифровывать патогенетические процессы, лежащие в основе заболеваний [3]. Влияние состава микробиоты кишечника и других локализаций на течение многих заболеваний человека является доказанным фактом. Если организм онкологического больного одновременно поражен каким-либо патогеном, то зачастую это крайне негативно сказывается как на клинической картине онкозаболевания, так и на тяжести инфекционного процесса [24]. Это одна из причин, по которой необходимо секвенировать геномы различных патогенов человека, чтобы увеличить эффективность антибиотикотерапии, противовирусной терапии и в кратчайшие сроки ликвидировать хотя бы инфекционный процесс [2, 20, 32, 75], (*Кубанов и др., Acta Naturae, 2018, 10 3(38), 79*). С другой стороны, известно, что бактерии и особенно вирусы могут позитивно сказываться на течении онкологического заболевания и даже официально использоваться в качестве терапевтических агентов. В сотрудничестве с

П. М. Чумаковым нами проведен поиск молекулярно-генетических маркеров чувствительности первичных клеточных линий [1, 83].

Не менее важно исследовать микробиоту человека и модельных животных, ее состав, нарушения при различных патологиях, а также механизмы, позволяющие поддерживать постоянство состава и препятствующие интродукции новых штаммов в сформированное сообщество микроорганизмов [4, 15, 16, 21, 34, 37, 38, 56, 57] (*Ивашкин и др., Рос.ж. гастроэнтер. гепат. колопр., 2022, 32, 19*).

Давно известно, что провоцировать возникновение онкологических заболеваний, в частности рака толстой кишки может хроническое воспаление [79]. Однако клинические, молекулярные и прогностические ассоциации инфекции и экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм полиаминов при этой нозологии, не до конца изучены.

Считается, что существует ассоциация между воспалением толстой кишки, а также прогрессией рака толстой кишки, с инфекцией энтеротоксигенной *Bacteroides fragilis* (ЕТВФ) (*Boleij et al, Clinical Infectious Diseases, 2015, 60, 208*). *B. fragilis* различаются способностью образовывать термостабильный энтеротоксин (фрагилизин), являющийся цинковой металлопротеазой. Энтеротоксин повреждает цитоскелет энтероцитов, разрушает структурно-функциональные контакты между ними, изменяя их секреторные свойства и вызывая дегенерацию. Таким образом, энтеротоксин способствует проникновению бактерий в более глубоко лежащие ткани и развитию воспалительной реакции. Фрагилизин вызывает активацию спермина оксидазы (SMO), которая отвечает за образование спермидина и перекиси водорода в качестве побочной реакции катаболизма полиаминов (*Goodwin et al, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108, 15354*). Перекись водорода, в свою очередь, усиливает воспаление и повреждение тканей. Более того, в нескольких нозологиях, включая КРР, усиление катаболизма полиаминов и продукция H₂O₂ были обнаружены нами как следствие ответа на химиотерапевтические агенты или специфические противоопухолевые аналоги полиаминов (*Van Zuylen et al, Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1949; Allen et al, Molecular Cancer Therapeutics, 2007, 6, 128; Pledgie et al, The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280, 39843; Pledgie-Tracy et al, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2010, 65, 1067; Mank-Seymour et al, Clinical Cancer Research, 1998, 4, 2003*).

На клеточной линии печени НераRG в сотрудничестве с группой А. В. Иванова, нами было показано, что активация катаболизма полиаминов N-1,N-11-диэтилнорспермином вызывает дифференцировку и мезенхимально-подобный фенотип клеток (*Ivanova et al, Cells, 2018, 7, 12275*).

Также была проведена оценка уровня экспрессии гена *SMOX* используя метод количественной ПЦР, наряду со степенью колонизации ЕТВФ, у больных раком толстой кишки. Статистически значимой корреляции между этими параметрами выявлено не

было [72]. Затем был определен уровень экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм полиаминов, метаболическое репрограммирование и регуляцию воспаления.

Мы обнаружили повышение экспрессии генов *SMOX*, *ODC1*, *SRM*, *SMS*, *MTAP*, *c-Myc*, *C/EBP β* (*CREBP*) и ряда других генов. Два медиатора метаболического репрограммирования, воспаления и клеточной пролиферации, *c-Myc* и *C/EBP β* , могут действовать в качестве регуляторов генов, вовлеченных в метаболизм полиаминов (*SMOX*, *AZIN1*, *MTAP*, *SRM*, *ODC1*, *AMD1* и *AGMAT*), поскольку они экспрессируются в опухолях на повышенном уровне, имеют сайты связывания согласно данным проекта ENCODE ChIP-Seq и демонстрируют согласованную экспрессию со своими мишенями. Таким образом, активация метаболизма полиаминов при раке толстой кишки может быть обусловлена скорее регуляцией *Myc* and *C/EBP β* , нежели инфекцией ЕТВF (рис. 15 и 16).

Известно, что *B. fragilis* является биомаркером наряду с мутационной нагрузкой, который позволяет оценить эффективность терапии чек-пойнт ингибиторами иммунного ответа при лечении злокачественных новообразований. Согласно существующей теории, это происходит потому, что состав кишечной микробиоты отражает иммунный статус индивидуума. Таким образом, сообщество микроорганизмов кишечника может быть одной из возможных терапевтических мишеней при лечении ЗНО, также оно может быть мишенью профилактических мероприятий, особенно в отношении КРР.

Кишечная микробиота продуцирует короткоцепочечные жирные кислоты, которые необходимы для нормального функционирования организма. Однако, несмотря на потенциальную пользу короткоцепочечных жирных кислот, в ряде исследований описано их негативное действие. Состав сообщества микроорганизмов кишечника коррелирует с уровнем производимого бутирата, то есть количеством доступной энергии, а также с иммунным статусом человека, в том числе с наличием хронического воспаления, проницаемостью кишечной стенки и др. При КРР энергетический обмен происходит нетипичным образом, так как при возникновении гипоксии/псевдогипоксии вместо метаболизма глюкозы клетка может продолжать использовать бутират, синтезируемый различными микроорганизмами, населяющими просвет кишечника. В совокупности, метаболиты кишечной микробиоты способны являться факторами, повышающими риск возникновения КРР, провоцирующими его, так как напрямую или опосредованно влияют на метаболизм клеток эпителия кишки.

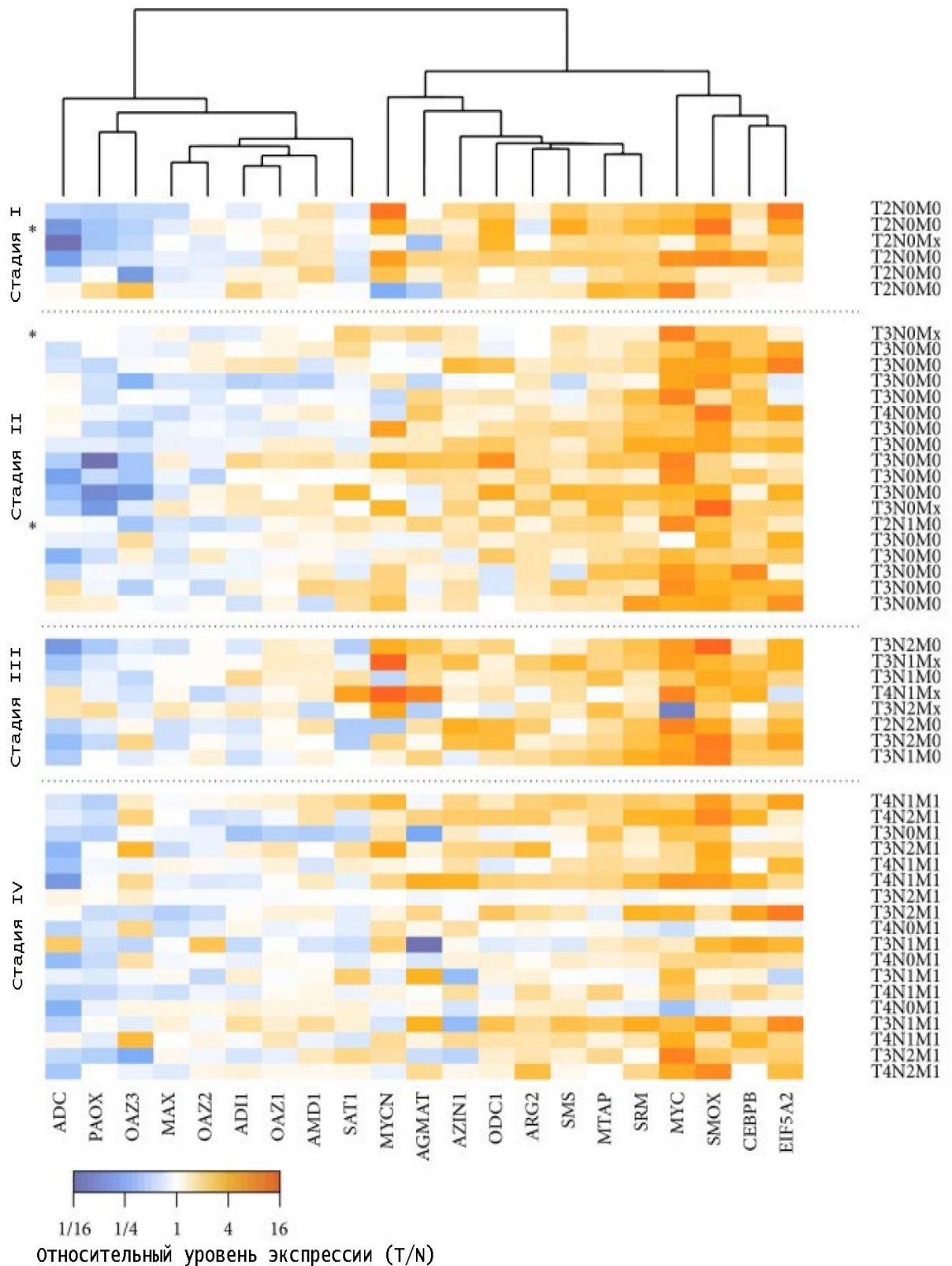


Рис. 15. Результаты анализа экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм полиаминов и регуляцию воспаления в парных образцах рака толстой кишки (метод ПЦР в режиме реального времени). Цвет ячеек указывает на изменение уровня экспрессии в опухоли по сравнению с условной нормой: повышение экспрессии – оранжевый, снижение – синий. Гены ранжированы согласно схожести экспрессионных профилей. Образцы с высокой концентрацией энтеротоксигенной *B. fragilis* DNA (>1000 копий на 1 нг totalной ДНК) отмечены звездочкой.

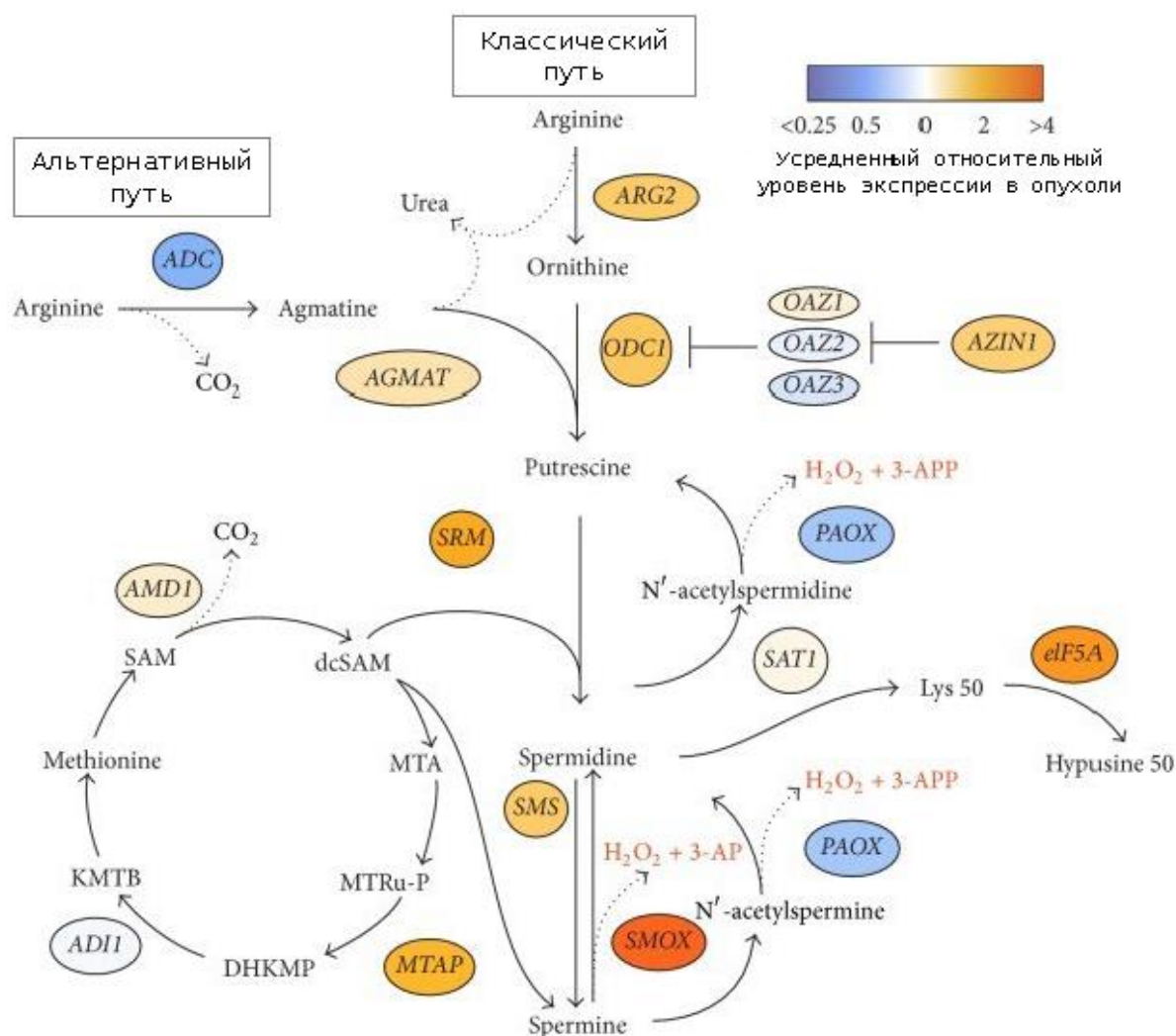


Рис. 16. Изменение уровня экспрессии генов, участников классического пути метаболизма полиаминов в образцах рака толстой кишки.

8. **Нарушения метаболизма, вызывающие возникновение опухолей, в аспекте возраст-зависимых изменений**

Старение затрагивает и трансформирует метаболические процессы в клетках, что делает их перспективными мишенями антиэйджинговой терапии, как показано на различных видах животных (*Parkhitko et al, Ageing Research, 2020, 64, 101188*). Например, показано, что внеклеточный GAPDH, один из основных ферментов гликолиза, участвует в прогрессии болезни Альцгеймера, стимулируя агрегацию β -амилоида и способствуя проявлению его цитотоксических свойств (*Lazarev et al, Aging and Diseases, 2021, 12, 1223*). Таким образом, нарушения метаболизма, возникающие в процессе старения, опосредованно вызывают и возраст-зависимые заболевания, в том числе, онкологические. Поиск геропротекторов, особенно продлевающих активную часть жизни, позволит отсрочить и время манифестации этих заболеваний. При этом часть лекарственных субстанций, использующихся против конкретных заболеваний, по-видимому, может выступать и в качестве геропротекторов (*Evgen'ev et al, Alzheimers Dis.,*

2019, 67, 1391). Наиболее показательным является пример лечения распространенного почечноклеточного рака препаратом темсиролимус, который представляет собой ацетилованный в положении 42 рапамицин – золотой стандарт среди геропротекторов.

Важной чертой позвоночных животных является то, что с течением жизни календарный возраст дает всё меньше возможности корректно оценить биологический возраст индивидуума. Здоровые особи, не подвергавшиеся какому-либо негативному воздействию, могут иметь различный биологический возраст, причем это различие нарастает к старости всё больше и больше. При исследовании антиэйджинговых интервенций на человеке или на модельных животных, важно уметь четко оценивать биологический возраст, так как это влияет на результаты. Для решения этой задачи нами был разработан относительно точный неинвазивный способ определения календарного и биологического возраста человека с использованием маркеров артериального здоровья [27].

В поисках способов продлить среднюю продолжительность жизни, особенно ее активного периода, проводят «омиксные» исследования. Это необходимо, во-первых, чтобы понять механизм действия применяемых интервенций, а во-вторых, чтобы научиться опознавать сигнатуры, потенциально полезные и потенциально опасные для организма. Нами были изучены различные воздействия на модельных животных: потенциально стрессовые интервенции [58, 61, 76], потенциально геропротекторные [33, 46, 59, 62, 63], в том числе, опосредованные генетическими вариантами [53, 63], (*Shaposhnikov et al, Communications Biology, 2022, 5, 1566*).

Одним из перспективных веществ оказался фукоксантин [62]. Нами было показано, что добавление в корм линии дикого типа Canton-S *Drosophila melanogaster* фукоксантина в концентрации 1 μM вызывает увеличение медианной продолжительности жизни самцов на 14,9% и самок на 6,2%. Установлено, что влияние фукоксантина на возрастные изменения транскриптома *Drosophila melanogaster* включает дифференциальную экспрессию генов, вовлеченных в различные метаболические процессы. Причем у самцов и самок изменяется различный набор метаболических процессов и сигнальных путей. На рисунках 17 и 18 представлены некоторые изменяющиеся процессы у самцов и самок, непосредственно связанные с тематикой диссертации.









KEGG ID	KEGG пути	Количество генов	Контроль	Количество генов	Фукоксантин
dme01200	Carbon metabolism	95		85	
dme01212	Fatty acid metabolism	35		35	
dme00010	Citrate cycle (TCA cycle)	34		30	
dme00240	Longevity regulating pathway - multiple species	29		29	

Рис.17. Влияние фукоксантина на возрастные изменения профиля экспрессии генов метаболических путей (согласно базе данных KEGG) в группе самцов *D. melanogaster*. Рамками

обозначены пути, р-значение которых по тесту Фишера $<0,05$ (красный цвет обозначает обогащение набором ДЭ генов с повышенной экспрессией, синий – с пониженной экспрессией).

KEGG ID	KEGG пути	Количество генов	Контроль	Количество генов	Фукоксантин
dme01200	Carbon metabolism	67		67	
dme00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	28		28	
dme00030	Pentose phosphate pathway	13		13	
dme04120	Ubiquitin mediated proteolysis	57		57	
dme04310	Wnt signaling pathway	34		34	
dme04330	Notch signaling pathway	16		16	

Рис. 18. Влияние фукоксантина на возрастные изменения профиля экспрессии генов метаболических путей (согласно базе данных KEGG) в группе самок *Drosophila melanogaster*. Рамками обозначены пути, р-значение которых по тесту Фишера $<0,05$ (красный цвет обозначает обогащение набором ДЭ генов с повышенной экспрессией, синий – с пониженной экспрессией).

На рисунке 17 видно, что у самцов дрозофил с возрастом подавляются пути, связанные с центральным метаболизмом углерода, циклом трикарбоновых кислот, изменяется также путь, связанный с регуляцией процессов старения. Особенно сильно выражено подавление метаболизма жирных кислот. Также обнаружено, что фукоксантин, по-видимому, изначально вызывает повышенную экспрессию генов, ассоциированных с лизосомальной и пероксисомальной активностями, хотя в дальнейшем и наблюдалось снижение экспрессии генов этих путей при старении у мух как контрольной группы, так и у мух, содержащихся на диете с фукоксантином. Результаты анализа показывают, что фукоксантин повлиял на профиль экспрессии генов многих путей, изменение которых, как ранее сообщалось, ассоциировано с процессами старения. Например, недавно на основе анализа транскриптомных данных позвоночных модельных организмов (*Mus musculus*, *Danio rerio*, *Nothobranchius furzeri*) и человека было показано, что во время старения наблюдается снижение экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез ненасыщенных жирных кислот. Согласно полученным нами данным, при старении мух, содержащихся на диете с фукоксантином, снижение активности этого пути было менее выраженным по сравнению с контрольной группой, что может быть связано с замедлением процессов старения. Среди путей, нарушенных у самок (рис.18), были идентифицированы: активация гликолиза и пентозо-фосфатного пути, убиквитин-опосредованного протеолиза, подавление сигнальных каскадов Wnt и Notch, которые контролируют многие процессы не только во время развития, но и при старении. Нами было показано ранее, что убиквитинлигаза MDM2 контролирует онкометаболизм (Шувалов и др., *Успехи молекулярной онкологии*, 2017, 4, 46).

Отдельное внимание в работе было уделено применению методов сравнительной геномики и транскриптомики для анализа причин различной продолжительности жизни у животных. То есть важно понять, как особенности генома и транскриптома определяют

максимальную продолжительность жизни различных видов. В качестве объекта исследований был выбран серый кит, *Eschrichtius robustus* (*E. robustus*), который входит в топ 1% наиболее долгоживущих млекопитающих. Он адаптирован к экстремальным морским условиям (прерывистая гипоксия, арктические воды, высокое давление) и имеет довольно большую продолжительность жизни, около 80 лет. Это единственный представитель семейства Eschrichtiidae, считающегося наиболее примитивным в классе Cetacea. Работа была выполнена в сотрудничестве с лабораторией А. С. Графодатского.

Проведена *de novo* сборка генома, а также транскриптома из тканей почек и печени *E. robustus*. Идентифицировано 10,895 генов [74]. Для анализа экспрессии генов серого кита и для сравнения его транскриптома с транскриптомами других короткоживущих и долгоживущих млекопитающих был использован новый метод, основанный на ранжировании. Нами было показано, что долгоживущие млекопитающие характеризуются сходными экспрессионными паттернами, включающими высокий уровень экспрессии генов репарации ДНК, убиквитинилирования, апоптоза и иммунного ответа. Помимо этого, анализ генов, ортологи которых были определены у модельных организмов как позитивно или негативно влияющие на продолжительность жизни, подтвердили свой статус, то есть у серого кита они работают аналогично. Интересно, что среди высокоэкспрессируемых генов, связанных с долгожительством, многие являются стресс-ассоциированными, влияющими на адаптацию к экстремальным условиям внешней среды. Проведенный анализ позволяет предполагать, что серый кит потенциально обладает высокой устойчивостью к стрессу и опухолеобразованию [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного исследования

Несмотря на то, что нарушения энергетического метаболизма в опухолевых клетках были выявлены Варбургом еще в 1926 году, молекулярные механизмы этого процесса до сих пор недостаточно хорошо изучены. Нами проведено исследование нарушений энергетического обмена опухолевых клеток на геномном, эпигеномном, транскриптомном и протеомном уровнях. Такой подход позволил обобщить существующие данные и сделать принципиально новые выводы.

Установлены особенности энергетического обмена в злокачественных опухолях различных нозологических категорий, идентифицированы прогностические маркеры и возможные терапевтические мишени. Разработаны алгоритмы идентификации групп опухолей, характеризующихся гиперметилированием генома, на основе данных высокопроизводительного секвенирования. В результате, на примере колоректального рака подтверждена гипотеза о взаимосвязи между активацией гликолиза, гиперметилированием генома, а также наличием ряда драйверных мутаций. Рак толстой кишки был рассмотрен более детально, так как он выбивается из общей картины в аспекте изменения метаболических процессов – активация гликолиза в этом случае

обнаруживается редко. Согласно нашей гипотезе, существенное влияние на патогенез заболевания оказывает микробиота кишечника, продуцирующая метаболиты, которые, минуя гликолиз, включаются напрямую в цикл трикарбоновых кислот эпителиальных клеток кишки. Наконец, онкологические заболевания рассмотрены как часть процесса старения организма, в целом это звенья одной цепи. Именно рассмотрение ЗНО как возраст-зависимых заболеваний важно для понимания механизмов патогенеза, а также для поиска методов коррекции и лечения.

Рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшая работа должна быть проведена по нескольким направлениям. Прежде всего, это валидация выявленных молекулярных маркеров и тестирование их на расширенных выборках пациентов. Также необходимо исследовать роль микробиоты в патогенезе различных онкологических заболеваний и других возраст-зависимых заболеваний, причем в совокупности с данными о гормональном и иммунном статусе пациентов. Тестирование новых интервенций, потенциально продлевающих активный период жизни человека, должно учитывать максимальный набор данных об интегральных системах организма.

ВЫВОДЫ

1. При сохранении тенденции к активации гликолиза и подавлению цикла Кребса в изученных ЗНО, эти процессы различаются и не включают генов, которые универсально активируются или инактивируются в большинстве нозологий. В ряду ПРЛ, АК, СРП, ПРП, РМЖ, РПЖ, КРР степень активации гликолиза постепенно уменьшается, в ряду СРП, ПРП, КРР, РМЖ, РПЖ, ПРЛ, АК уменьшается степень подавления цикла Кребса. Главенствующую роль в подавлении экспрессии играет гиперметилирование ДНК, в то время как повышение экспрессии обеспечивают, главным образом, регуляторные микроРНК и ТФ.

2. Гены, вовлеченные в энергетический обмен, могут быть перспективными прогностическими маркерами, в частности, гексокиназы при РМЖ и КРР, и включаться в состав диагностических панелей, увеличивающих предсказательную силу индивидуального маркера. Например, активация *HK3* коррелирует с повышенным уровнем экспрессии семи генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом при КРР.

3. Экспериментальное подавление наиболее часто активирующегося в опухолях фермента гликолиза, гексокиназы 2, на модели КРР показало, что клетки быстро адаптируются к нарушениям функционирования компонентов энергетического обмена. Таким образом, в случае разработки подобных препаратов требуется инактивировать сразу несколько генов, что влечет необходимость создания точных адресных систем доставки.

4. Для РПЖ, РМЖ, РЛ, РП выбраны параметры, позволяющие сформировать группы образцов, характеризующихся гиперметилованием генома. Показано, что для ряда нозологических категорий (как минимум, КРР и РПЖ) гиперметилование генома ассоциировано с активацией гликолиза. Причем ген *OGDHL*, для которого опухолевое подавление экспрессии опосредовано гиперметилованием промотора, является маркером CIMP+ фенотипа при КРР.

5. Два медиатора метаболического репрограммирования, воспаления и клеточной пролиферации, с-Мус и *C/EBPβ*, принимают участие в регуляции генов, вовлеченных в метаболизм полиаминов (*SMOX, AZINI, MTAP, SRM, ODC1, AMD1* и *AGMAT*); активация метаболизма полиаминов при раке толстой кишки обусловлена скорее регуляцией Мус and *C/EBPβ*, нежели инфекцией энтеротоксигенной *B. fragilis*.

6. Нетипично малая доля опухолей КРР с усиленным метаболизмом глюкозы может объясняться широкой доступностью в просвете кишечника высокоэнергетического бутирата, продуцируемого кишечной микрофлорой.

7. Нарушение энергетического обмена характерно для большинства стареющих организмов и ассоциировано с манифестацией возраст-зависимых заболеваний, в том числе, онкологических. Геропротекторы, рассмотренные в работе, тормозят возрастные метаболические изменения в организме. Другой возможностью уменьшить скорость старения является воздействие на стресс-ассоциированные гены, влияющие на адаптацию к экстремальным условиям внешней среды, так как они связаны с долгожительством.

СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

(с указанием квартилей **Q1** и **Q2** для статей, опубликованных в 2013-2022 гг.)

1. Белова А. А., Сосновцева А. О., Липатова А. В., Нюшко К. М., Волченко Н. Н., Беляков М. М., Судаленко О. В., Крашенинников А. А., Шегай П. В., Садритдинова А. Ф., Федорова М. С., Воробьев Н. В., Алексеев Б. Я., Каприн А. Д., **Кудрявцева А. В.** Молекулярно-генетические маркеры чувствительности первичных клеточных линий рака предстательной железы к вирусу Сендай. // Молекулярная биология. – **2017**. - Т. 51, 1-10.
2. Гостев В. В., Калиногорская О. С., Юдин С. М., Дмитренко О. А., **Кудрявцева А. В.**, Сидоренко С. В. Полиморфизм генов, участвующих в сборке клеточной стенки у метициллинорезистентных *Staphylococcus aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину // Антибиотики и химиотерапия. – **2018**. – Т. 63(7), 11 – 16.
3. Кардымон О. Л., **Кудрявцева А. В.** Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника. // Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. - **2016**. - Т. 26, 4-13.

4. Кашух Е. А., Полуэктова Е. А., **Кудрявцева А. В.**, Краснов Г. С., Казей В. И., Соболев П. Д., Гремякова П. В., Ивашкин В. Т. Влияние рифаксимины и мультиштаммового пробиотика на кишечный микробиом и показатели сердечно-сосудистого риска у пациентов с ишемической болезнью сердца // Рос.ж. гастроэнтер. гепат. колопр. – **2019**. – Т. 29(4), 38 – 49.
5. Краснов Г.С., Дмитриев А.А., **Кудрявцева А.В.**, Анедченко Е.А., Опарина Н.Ю., Сенченко В.Н. Новые программы, используемые при количественной оценке копийности и уровня транскрипции генов. // Труды МФТИ. - **2010**. – Т. 2, 23-27.
6. Краснов Г. С., Дмитриев А. А., Садритдинова А. Ф., Волченко Н. Н., Славнова Е. Н., Данилова Т. В., Снежкина А. В., Мельникова Н. В., Федорова М. С., Лакунина В. А., Белова А. А., Ньюшко К. М., Алексеев Б. Я., Каприн А. Д., **Кудрявцева А. В.** Молекулярно-генетические механизмы формирования лекарственной устойчивости при терапии рака предстательной железы. // Молекулярная биология. – **2015**. - Т. 49, 716-727.
7. Краснов Г. С., Федорова М. С., Снежкина А. В., Садритдинова А. Ф., Мельникова Н. В., Потеряхина А. В., Ньюшко К. М., Сидоров Д. В., Беляков М. М., Каприн А. Д., Дмитриев А. А., Зарецкий А. Р., **Кудрявцева А. В.** Оценка экспрессии генов гексокиназ при колоректальном раке с применением методов биоинформатики. // Биофизика. – **2015**. - Т. 60, 1050–1056.
8. **Кудрявцева А. В.**, Ньюшко К. М., Зарецкий А. Р., Шагин Д. А., Садритдинова А. Ф., Федорова М. С., Савватеева М. В., Гуватова З. Г., Пудова Е. А., Алексеев Б. Я., Дмитриев А. А., Снежкина А. В. Снижение экспрессии гена *NROB2* при светлоклеточном раке почки связано с гиперметилированием его промоторной области. // Молекулярная биология. – **2018**. – Т. 52 (3), 482-488.
9. Лебедев Т. Д., Спирин П. В., Орлова Н. Н., **Кудрявцева А. В.**, Мельникова Н. В., Сперанская А. С., Прасолов В. С. Поиск генов, участвующих в развитии лейкозов, с помощью РНК-интерференции и глубокого секвенирования. // ДАН. – **2013**. - Т. 448, 49-51.
10. Лукьянова Е. А., Федорова М. С., Пудова Е. А., Наседкина Т. В., Степанова Е. А., Ньюшко К. М., Попов А. Ю., Коробан Н. В., Дмитриев А. А., Киселева М. В., Липатова А. В., Заседателев А. С., **Кудрявцева А. В.** Особенности экспрессионного профиля больных злокачественной меланомой в зависимости от ответа на иммунотерапию. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – **2017**. – Т. 21(8), 925-931.
11. Ньюшко К. М., Лукьянова Е. Н., Алексеев Б. Я., Ефремов Г., Краснов Г. С., Харитонов С. Л., Пудова Е. А., Киселева М. В., Каприн А. Д., **Кудрявцева А. В.** Прогностические маркеры местно-распространенного рака предстательной железы. // Онкология. Журнал им П.А. Герцена. – **2018**. - Т. 6.
12. Опарина Н. Ю., Садритдинова А. Ф., Снежкина А. В., Дмитриев А. А., Краснов Г. С., Сенченко В. Н., Мельникова Н. В., Беленикин М. С., Лакунина В. А., Веселовский В. А., Степанов О. А., **Кудрявцева А. В.** Повышение экспрессии гена *NETO2* как

- потенциальный молекулярно-генетический маркер при раке почки и легкого. // Генетика. – 2012. - Т. 48, 599–607.
13. Опарина Н. Ю., Снежкина А. В., Садритдинова А. Ф., Веселовский В. А., Дмитриев А. А., Сенченко В. Н., Мельникова Н. В., Сперанская А. С., Дарий М. В., Степанов О. А., Бархатов И. М., **Кудрявцева А. В.** Дифференциальная экспрессия генов, кодирующих ферменты гликолиза, при раке почки и легкого человека. // Генетика. – 2013. - Т. 49, 814-823.
 14. Пудова Е. А., Снежкина А. В., Ермощенко М. В., Харитонов С. Л., Сухотько А. С., Федорова М. С., Садритдинова А. Ф., Гуватова З. Г., Савватеева Е. В., Мельникова Н. В., Ньюшко К. М., Дмитриев А. А., Каприн А. Д., Алексеев Б. Я., Зирияходжаев А. Д., **Кудрявцева А. В.** Экспрессия генов *HK1* и *HK2* при тройном негативном и люминальном А раке молочной железы. // Биологические мембраны. – 2018. - Т. 35(4), 328-333.
 15. Румянцева Д. Е., Трухманов А. С., **Кудрявцева А. В.**, Ивашкин В. Т. Влияние кислотосупрессии на микробиоту желудочно-кишечного тракта // Рос.ж. гастроэнтер. гепат. колопр. – 2018. – Т. 28(1), 78 – 88.
 16. Румянцева Д. Е., Трухманов А. С., **Кудрявцева А. В.**, Краснов Г. С., Параскевова А. В., Сторонова О. А., Пономарев А. Б. Микробиота пищевода и желудка у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и здоровых добровольцев // Рос.ж. гастроэнтер. гепат. колопр. – 2018. - Т. 28(4), 36 – 46.
 17. Снежкина А. В., Краснов Г. С., Жикривецкая С. О., Карпова И. Ю., Федорова М. С., Ньюшко К. М., Беляков М. М., Гнучев Н. В., Сидоров Д. В., Алексеев Б. Я., Мельникова Н. В., **Кудрявцева А. В.** Сверхэкспрессия микроРНК *miR-9*, *miR-98* и *miR-199* коррелирует с подавлением экспрессии гена *HK2* при колоректальном раке. // Молекулярная биология. – 2018. - Т. 52(2), 220–230.
 18. Снежкина А. В., Ньюшко К. М., Зарецкий А. Р., Шагин Д. А., Садритдинова А. Ф., Федорова М. С., Гуватова З. Г., Абрамов И. С., Пудова Е. А., Алексеев Б. Я., Дмитриев А. А., **Кудрявцева А. В.** Транскрипционный фактор *SAP30* вовлечен в активацию экспрессии гена *NETO2* при светлоклеточном раке почки. // Молекулярная биология. - 2018, - Т. 52(3), 451-459.
 19. Снежкина А. В., Федорова М. С., Калинин Д. В., Садритдинова А. Ф., Гуватова З. Г., Пудова Е. А., Мельникова Н. В., Краснов Г. С., Черниченко М. А., Алексеев Б. Я., Дмитриев А. А., **Кудрявцева А. В.** Повышение экспрессии гена *NETO2*, кодирующего трансмембранный белок, при опухоли Клатскина. // Биологические мембраны. - 2018. - Т. 35(4), 328-333.
 20. Сперанская А. С., Мельникова Н. В., Беленикин М. С., Дмитриев А. А., Опарина Н. Ю., **Кудрявцева А. В.** Генетическое разнообразие и эволюция вируса гриппа С. // Генетика. – 2012. – Т. 8, 797-805.

21. Фадеева М. В., **Кудрявцева А. В.**, Краснов Г. С., Схиртладзе М. Р., Ивашкин В. Т. Кишечная микробиота у больных хронической сердечной недостаточностью с систолической дисфункцией // Рос.ж. гастроэнтер. гепат. колопр. – 2020. – Т. 30(2), 35 – 44.
22. Федорова М. С., Карпова И. О., Липатова А. В., Пудова Е. А., Гуватова З. Г., Кочетков Д. В., Чайка А. В., Алексеев Б. Я., Киселева М. В., Каприн А. Д., **Кудрявцева А. В.**, Снежкина А. В. Ингибирование гексокиназы 2 приводит к снижению экспрессии ферментов гликолиза *PFKP*, *BPGM* и *GPI* в клеточной линии RKO. // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017, - Т. 21(8), 932-936.
23. Федорова М. С., **Кудрявцева А. В.**, Лакунина В. А., Снежкина А. В., Волченко Н. Н., Славнова Е. Н., Данилова Т. В., Садритдинова А. Ф., Мельникова Н. В., Белова А. А., Климина К. М., Сидоров Д. В., Алексеев Б. Я., Каприн А. Д., Дмитриев А. А., Краснов Г. С. Понижение экспрессии гена *OGDHL* ассоциировано с гиперметилением промоторной области при колоректальном раке. // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, 678-688.
24. Чеботкевич В. Н., Бурyleв В. В., Кайтанджан Е. И., Бессмельцев С. С., Шилова Е. Р., Яцьшина С. Б., **Кудрявцева А. В.** Этиологические и клинические особенности инфекционных осложнений при гемобластозах. // Онкогематология. – 2010. – Т. 4, 14-19.
25. (Q1) Beniaminov A., Puzanov G., Krasnov G., Kaluzhny D., Kazubskaya T., Braga E., **Kudryavtseva A.**, Melnikova N., Dmitriev A. Deep sequencing revealed a CpG methylation pattern responsible for *ALDH1L1* suppression in breast cancer. // Frontiers in Genetics. – 2018. - V. 9, 169.
26. (Q2) Dmitriev A. A., Rudenko E. E., **Kudryavtseva A. V.**, Krasnov G. S., Gordiyuk V. V., Melnikova N. V., Stakhovsky E. O., Kononenko O. A., Pavlova L. S., Kondratieva T. T., Alekseev B. Y., Braga E. A., Senchenko V. N., Kashuba V. I. Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma. // Biomed Res Int. - 2014. - 735292.
27. (Q1) Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I., Ryabaya O., Stepanova E., **Kudryavtseva A.**, Sadritdonova A., Dzhumakova Ch., Belysheva T., Surzhikov S., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. Detection of *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *GNAQ*, *GNA11* and *MAP2K1/2* mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis. // Oncotarget. - 2017. -V. 8(32), 52304-52320.
28. (Q1) Fedintsev A., Kashtanova D., Tkacheva O., Strazhesko I., **Kudryavtseva A.**, Baranova A., Moskalev A. Markers of arterial health could serve as accurate non-invasive predictors of human biological and chronological age. // Aging (Albany NY). – 2017. - V. 9(4), 1280-1292.
29. (Q2) Fedorova M. S.*, Snezhkina A. V.*, Pudova E. A., Abramov I. S., Lipatova A. V., Kharitonov S. L., Sadritdinova A. F., Nyushko K. M., Klimina K. M., Belyakov M. M., Slavnova E. N., Melnikova N. V., Chernichenko M. A., Sidorov D. V., Kaprin A. D., Alekseev

- B. Y., Dmitriev A. A., **Kudryavtseva A. V.** Upregulation of *NETO2* gene in colorectal cancer. // *BMC Genetics*. - **2017**. - 18(Suppl 1), 117.
30. (Q3) Fedorova M. S., Krasnov G. S., Lukyanova E. N., Zaretsky A. R., Dmitriev A. A., Melnikova N. V., Moskalev A. A., Kharitonov S. L., Pudova E. A., Guvatova Z. G., Kobelyatskaya A. A., Ishina I. A., Slavnova E. N., Lipatova A. V., Chernichenko M. A., Sidorov D. V., Popov A. Y., Kiseleva M. V., Kaprin A. D., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.** The CIMP-high phenotype is associated with energy metabolism alterations in colon adenocarcinoma // *BMC Med Genet*. – **2019**. - V. 20, 52.
31. (Q2) Fedorova M. S., Snezhkina A. V., Lipatova A. V., Pavlov V. S., Kobelyatskaya A. A., Guvatova Z. G., Pudova E. A., Savvateeva M. V., Ishina I. A., Demidova T. B., Volchenko N. N., Trofimov D. Y., Sukhikh G. T., Krasnov, G. S., **Kudryavtseva, A. V.** *NETO2* is deregulated in breast, prostate, and colorectal cancer and participates in cellular signaling. // *Frontiers in Genetics*. – **2020**. - V. 11, 594933.
32. Golomidova A. K., Kulikov E. E., **Kudryavtseva A. V.**, Letarov A. V., Complete genome sequence of *Escherichia coli* bacteriophage PGT2 // *Microbiol. resour. announc.* – **2018**. – V. 6, 3e01370-17.
33. (Q2) Guvatova Z., Dalina A., Marusich E., Pudova E., Snezhkina A., Krasnov G., **Kudryavtseva A.**, Leonov S., Moskalev A. Protective effects of carotenoid fucoxanthin in fibroblasts cellular senescence // *Mech. Ageing Dev.* – **2020**. – V. 189, 111260.
34. Ivashkin V. T., **Kudryavtseva A. V.**, Krasnov G. S., Poluektov Y. M., Morozova M. A., Shifrin O. S., Beniashvili A. G., Mamieva Z. A., Kovaleva A. L., Ulyanin A. I., Trush E. A., Erlykin A. G., Poluektova E. A. Efficacy and safety of a food supplement with standardized menthol, limonene, and gingerol content in patients with irritable bowel syndrome: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial // *Plos One*. – **2022**. – V. 17, 6e0263880.
35. (Q1) Karpov D. S., Spirin P. V., Zheltukhin A. O., Tutyaeva V. V., Zinovieva O. L., Grineva E. N., Matrosova V. A., Krasnov G. S., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Prassolov V. S., Mashkova T. D., Lisitsyn N. A. LINC00973 Induces proliferation arrest of drug-treated cancer cells by preventing p21 degradation. // *Int J Mol Sci*. – **2020**. – V. 21(21), 8322.
36. Kharitonov S, Zikiriahodzhaev A, Ermoshchenkova M, Sukhot'ko A, Fedorova M, Pudova E, Alekseev B, Kaprin A, **Kudryavtseva A.** Hexokinases in breast cancer. // *International journal of bioscience and biotechnology*. – **2017**. - V. 4(2), 110-116.
37. (Q2) Klimina K. M., Batotsyrenova E. G., Yunes R. A., Gilyaeva E. H., Poluektova E. U., Kostrova T. A., **Kudryavtseva A. V.**, Odorskaya M. V., Kashuro V. A., Kasianov A. S., Ivanov M. B., Danilenko V. N. The effects of desynchronization on the gut microbiota composition and physiological parameters of rats // *BMC Microbiol.* – **2019**. - V. 19, 1.
38. (Q1) Klimina K. M., Kasianov A. S., Poluektova E. U., Emelyanov K. V., Voroshilova V. N., Zakharevich N. V., **Kudryavtseva A. V.**, Makeev V. J., Danilenko V. N. Employing toxin-antitoxin genome markers for identification of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in human metagenomes // *Peer J*. – **2019**. - V. 7, e6554.

39. (Q2) Kobelyatskaya A.A, Pudova E.A., Fedorova M.S., Nyushko K.M., Alekseev B.Y., Kaprin A.D., Trofimov D.Y., Sukhikh G.T., Snezhkina A.V., Krasnov G.S, Razin S.V., **Kudryavtseva A.V.** Differentially methylated CpG sites associated with the high-risk group of prostate cancer // *Journal of Integrative Bioinformatics*. – 2020. – (4), 1-11.
40. (Q2) Kobelyatskaya A.A, Pudova E.A., Snezhkina A.V., Fedorova M.S., Pavlov V.S., Guvatova Z.G., Savvateeva M.V., Melnikova N.V., Dmitriev A.A., Trofimov D.Y., Sukhikh G.T., Nyushko K.M., Alekseev B.Y., Razin S.V., Krasnov G.S, **Kudryavtseva A.V.** Impact TMPRSS2-ERG molecular subtype to prostate cancer recurrence // *Life*. – 2021. – (6) P, 588.
41. (Q2) Krasnov G. S., **Kudryavtseva A. V.**, Snezhkina A. V., Lakunina V. A., Beniaminov A. D., Melnikova N. V., Dmitriev A. A. Pan-cancer analysis of TCGA data revealed promising reference genes for qPCR normalization // *Front Genet*. - 2019. - V. 10, 97.
42. (Q1) Krasnov G. S., Dmitriev A. A., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.** Deregulation of glycolysis in cancer: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a therapeutic target // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2013. - V. 17, 681-693.
43. (Q1) Krasnov G. S., Dmitriev A. A., Lakunina V. A., Kirpiy A. A., **Kudryavtseva A. V.** Targeting VDAC-bound hexokinase II: a promising approach for concomitant anti-cancer therapy. // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2013. - V. 17, 1221-1233.
44. (Q1) Krasnov G. S., Dmitriev A. A., Melnikova N. V., Zaretsky A. R., Nasedkina T. V., Zasedatelev A. S., Senchenko V. N., **Kudryavtseva A. V.** CrossHub: a tool for multi-way analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) in the context of gene expression regulation mechanisms. // *Nucleic Acids Res*. - 2016. - V. 44, e62.
45. (Q1) Krasnov G. S., Snezhkina A.V., Zaretsky A. R, Zhavoronkov A., Moskalev A. A., Karpova I. Y., Afremova A. Y., Lipatova A. V., Kochetkov D. V., Fedorova M. S., Volchenko N. N., Sadritdinova A. F., Nyushko K. M., Melnikova N. V., Sidorov D. V., Popov A. Y., Kaprin A. D., Alekseev B. Y., Dmitriev A. A., **Kudryavtseva A.V.** Differential expression of alternatively spliced transcripts related to energy metabolism in colorectal cancer. // *BMC Genomics*. – 2016. - V. 17, 1011.
46. (Q1) **Kudryavtseva A. V.**, Krasnov G. S. Lipatova A. V., Alekseev B. Y., Maganova F. I., Proshkina, Shaposhnikov M., Fedorova M. S., Snezhkina A. V., Moskalev A. A. Effects of *Abies sibirica* terpens on cancer- and aging-associated pathways in human cells. // *Oncotarget*. – 2016. - V. 7, 83744-83754.
47. (Q1) **Kudryavtseva A. V.**, Lipatova A. O., Zaretsky A. R., Moskalev A. A., Fedorova M. S., Rasskazova A. S., Shibukhova G. A., Snezhkina A. V., Kaprin A. D., Alekseev B. Y., Dmitriev A. A., Krasnov G. S. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. // *Oncotarget*. – 2016. - V. 7, 53959-53983.
48. (Q2) **Kudryavtseva A. V.**, Lukyanova E. N., Kalinin D. V., Zaretsky A. R., Pokrovsky A. V., Golovyuk A. L., Fedorova M. S., Pudova E. A., Kharitonov S. L., Pavlov V. S., Kobelyatskaya A. A., Melnikova N. V., Dmitriev A. A., Polyakov A. P., Alekseev B. Y., Kiseleva M. V.,

- Kaprin A. D., Krasnov G. S., Snezhkina A. V. Mutational load in carotid body tumor // BMC Medical Genomics. – 2019. – V. 12 (Suppl 2), 39.
49. **Kudryavtseva A. V.**, Nyushko K. M., Zaretsky A. R., Shagin D. A., Kaprin A. D., Alekseev B. Y., Snezhkina A. V. Upregulation of RARB, RARG, and RORC genes in clear cell renal cell carcinoma. // Biomedical and Pharmacology Journal. – 2016. – T. 9, 967-975.
50. **Kudryavtseva A. V.**, Nyushko K. M., Zaretsky A. R., Shagin D. A., Alekseev B. Y., Kaprin A. A., Snezhkina A. V. Deregulation of *RBP4* and *RBP7* genes in clear cell renal cell carcinoma. // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2017. – V. 11 (1) (Suppl), 183-186.
51. **Kudryavtseva A. V.**, Nyushko K. M., Zaretsky A. R., Shagin D. A., Krasnov G. S., Pudova E. A., Alekseev B. Y., Snezhkina A. V. Expression of *HK2* gene is deregulated in prostate cancer. // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2017. - 11 (1) (Suppl), 158-161.
52. **Kudryavtseva A. V.**, Lukyanova E. N., Kharitonov S. L., Nyushko K. M., Krasheninnikov A. A., Pudova E. A., Guvatova Z. G., Alekseev B. Y., Kiseleva M. V., Kaprin A. D., Dmitriev A. A., Snezhkina A. V., Krasnov G. S. Bioinformatic identification of differentially expressed genes associated with prognosis of locally advanced lymph node-positive prostate cancer. // J Bioinf Comput Biol. – 2019. – V. 17, 11950003.
53. (Q1) Lashmanova E., Zemskaia N., Proshkina E., **Kudryavtseva A.**, Volosnikova M., Marusich E., Leonov S., Zhavoronkov A., Moskalev A. The Evaluation of geroprotective effects of selected flavonoids in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. // Front Pharmacol. – 2017. - V. 8, 884.
54. (Q1) Le J., Xu J., Zheng J., Li B., Zheng T., Lu Y., Shen W., **Kudryavtseva A. V.**, Katanaev V.L., Shao J., Jia L. One nanometer self-assembled aptamer-DNA dendrimers carry 350 doxorubicin: Super-stability and intra-nuclear DNA comet tail. // [Chemical Engineering Journal](#). – 2020. – V. 388, 124170.
55. (Q1) Loginov V. I., Dmitriev A. A., Senchenko V. N., Pronina I. V., Khodyrev D. S., **Kudryavtseva A. V.**, Krasnov G. S., Gerashchenko G. V., Chashchina L. I., Kazubskaya T. P., Kondratieva T. T., Lerman M. I., Angeloni D., Braga E. A., Kashuba V. I. Tumor suppressor function of the *SEMA3B* gene in human lung and renal cancers. // PLoS One. – 2015. - V. 10, e0123369.
56. Maslennikov R., Ivashkin V., Alieva A., Poluektova E., **Kudryavtseva A.**, Krasnov G., Zharkova M., Zharikov Y. Gut dysbiosis and body composition in cirrhosis // World Journal of Hepatology. – 2022. – V. 14(6), 1210 – 1225.
57. Maslennikov R., Ivashkin V., Efremova I., Poluektova E., **Kudryavtseva A.**, Krasnov G. Gut dysbiosis and small intestinal bacterial overgrowth as independent forms of gut microbiota disorders in cirrhosis // World J Gastroenterol. – 2022. - V. 28(10), 1067 – 1077.
58. (Q1) Moskalev A., Shaposhnikov M., Snezhkina A., Kogan V., Plyusnina E., Peregudova D., Melnikova N., Uroshlev L., Mylnikov S., Dmitriev A., Plusnin S., Fedichev P., **Kudryavtseva A.** Mining gene expression data for pollutants (dioxin, toluene, formaldehyde) and low dose of gamma-irradiation. // PLoS One. – 2014. - V. 9, e86051.

59. (Q1) Moskalev A., Chernyagina E., **Kudryavtseva A.**, Shaposhnikov M. Geroprotectors: a unified concept and screening approaches. // *Aging and Disease*. – 2017. - V. 8.
60. (Q1) Moskalev A. A., **Kudryavtseva A. V.**, Graphodatsky A. S., Beklemisheva V. R., Serdyukova N. A., Krutovsky K. V., Sharov V. V., Kulakovskiy I. V., Lando A. S., Kasianov A. S., Kuzmin D. A., Putintseva Yu. A., Feranchuk S. I., Shaposhnikov M. V., Fraifeld V. E., Toren D., Snezhkina A. V., Sitnik V. V. *De novo* assembling and primary analysis of genome and transcriptome of gray whale *Eschrichtius robustus*. // *BMC Evol Biol*. - 2017. - V. 17(Suppl 2), 258.
61. (Q1) Moskalev A., Zhikrivetskaya S., Krasnov G., Shaposhnikov M, Proshkina E., Borisoglebsky D., Danilov A., Peregudova D., Sharapova I., Dobrovolskaya E., Solovev I., Zemsкая N., Shilova L., Snezhkina A., **Kudryavtseva A.** A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing radiation, starvation and cold shock. // *BMC Genomics*. - 2015. - V. 16, S8.
62. (Q1) Moskalev A., Shaposhnikov M., Zemsкая N., Belyi A., Dobrovolskaya E., Patova A., Guvatova Z., Lukyanova E., Snezhkina A., **Kudryavtseva A.** Transcriptome analysis reveals mechanisms of geroprotective effects of fucoxanthin in *Drosophila*. // *BMC Genomics*. – 2018. – Vol. 19 (S3), 77.
63. (Q1) Proshkina E. N., Shaposhnikov M. V., Sadritdinova A. F., **Kudryavtseva A. V.**, Moskalev A. A. Basic mechanisms of longevity: a case study of *Drosophila* pro-longevity genes. // *Ageing Res Rev*. - 2015. - V. 24, 218-231.
64. (Q1) Proshkina E., Lashmanova E., Dobrovolskaya E., **Kudryavtseva A.**, Shaposhnikov M., Moskalev A. Geroprotective and radioprotective activity of quercetin, (-)-epicatechin, and ibuprofen in *Drosophila melanogaster*. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2016. - V. 7, 505.
65. (Q2) Pudova E. A., Krasnov G. S., Nyushko K. M., Kobelyatskaya A. A., Savvateeva M. V., Poloznikov A. A., Dolotkazin D. R., Klimina K. M., Guvatova Z. G., Simanovsky S. A., Gladyshev N. S., Tokarev A. T., Melnikova N. V., Dmitriev A. A., Alekseev B. Y., Kaprin A. D., Kiseleva M. V., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.** miRNAs expression signature potentially associated with lymphatic dissemination in locally advanced prostate cancer. // *BMC Med Genomics*. - 2020. – V. 13(Suppl 8), 129.
66. (Q1) Pudova E. A., **Kudryavtseva A. V.**, Fedorova M. S., Zaretsky A. R., Shcherbo D. S., Lukyanova E. N., Popov A. Y., Sadritdinova A. F., Abramov I. S., Kharitonov S. L., Krasnov G. S., Klimina K. M., Volchenko N. N., Nyushko K. M., Melnikova N. V., Chernichenko M. A., Sidorov D. V., Alekseev B. Y., Kiseleva M. V., Kaprin A. D., Dmitriev A. A., Snezhkina A. V. *HK3* overexpression is associated with epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. // *BMC Genomics*. – 2018. - V. 19(Suppl 3), 113.
67. (Q2) Pudova E. A., Lukyanova E. N., Nyushko K. M., Mikhaylenko D. S., Zaretsky A. R., Snezhkina A. V., Savvateeva M. V., Kobelyatskaya A. A., Melnikova N. V., Volchenko N. N., Efremov G. D., Klimina K. M., Belova A. A., Kiseleva M. V., Kaprin A. D., Alekseev B. Y.,

- Krasnov G. S., **Kudryavtseva A. V.** Differentially expressed genes associated with prognosis in locally advanced lymph node-negative prostate cancer. // *Front Genet.* - **2019.** - V. 10, 730.
68. (Q2) Pudova E. A., Krasnov G. S., Kobelyatskaya A. A., Savvateeva M. V., Fedorova M. S., Pavlov V. S., Nyushko K. M., Kaprin A. D., Alekseev B. Y., Trofimov D. Y., Sukhikh G. T., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.** Gene expression changes and associated pathways involved in the progression of prostate cancer advanced stages // *Front Genet.* - **2021.** - V. 11, 613162.
69. Pudova E. A., Kobelyatskaya A. A., Katunina I. V., Snezhkina A. V., Fedorova M. S., Guvatova Z. G., Nyushko K. M., Alekseev B. Y., Pavlov V. S., Savvateeva M. V., Kudryavtsev A. A., Krasnov G. S., **Kudryavtseva A. V.** Dynamic profiling of exosomal microRNAs in blood plasma of patients with castration-resistant prostate cancer. // *Frontiers In Bioscience Scholar.* – **2022.** – V. 14, 15.
70. Senchenko V. N., Dmitriev A. A., Krasnov G. S., **Kudryavtseva A. V.**, Dardyk M. V., Beniaminov A. D., Kondratieva T. T. Strong down-regulation of tumor suppressor genes *RBI* and *CTDSPL* is associated with aberrant expression of cell cycle regulation genes in non-small cell lung cancer. // *Austin J Cancer Clin Res.* – **2015.** – V. 2, 1062.
71. (Q1) Shuvalov O., Kizenko A., Petukhov A., Fedorova O., Daks A., Bottrill A., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Barlev N. SEMG1/2 augment energy metabolism of tumor cells. // *Cell Death Dis.* – **2020.** - V. 11(12), 1047.
72. (Q1) Snezhkina A. V., Krasnov G. S., Lipatova A. V., Sadritdinova A. F., Kardymon O. L., Fedorova M. S., Melnikova N. V., Stepanov O. A., Zaretsky A. R., Kaprin A. D., Alekseev B. Y., Dmitriev A. A., **Kudryavtseva A. V.** The dysregulation of polyamine metabolism in colorectal cancer is associated with overexpression of c-Myc and C/EBP β rather than enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – **2016.** - 2353560.
73. (Q1) Tchurikov N. A., Fedoseeva D. M., Sosin D. V., Melnikova N. V., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Kravatsky Y. V., Kretova O. V. Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulations. // *J Mol Cell Biol.* – **2015.** - V. 7, 366-382.
74. (Q1) Toren D., Kulaga A., Jethva M., Rubin E., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Nowicki D., Tacutu R., Moskalev A. A., Fraifeld V. E. Gray whale transcriptome reveals longevity adaptations associated with DNA repair, autophagy and ubiquitination. // *Aging Cell.* – **2020.** - V. 19, e13158.
75. (Q1) Zakharevich N. V., Averina O. V., Klimina K. M., **Kudryavtseva A. V.**, Kasianov A. S., Makeev V. J., Danilenko V. N. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* GT15: identification and characterization of unique and global regulatory genes. // *Microb Ecol.* - **2015.** - V. 70, 819-834.
76. (Q1) Zhikrevetskaya S., Peregudova D., Danilov A., E. Plyusnina, G. Krasnov, A. Dmitriev, **A. Kudryavtseva**, M. Shaposhnikov. A. Moskalev. Effect of low doses (5-40 cGy) of gamma-

irradiation on lifespan and stress-related genes expression profile in *Drosophila melanogaster*. // PLoS One. **2015**. - V. 10, e0133840.

77. (Q1) Zinovieva O. L., Grineva E. N., Prokofjeva M. M., Karpov D. S., Zheltukhin A. O., Krasnov G. S., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Chumakov P. M., Mashkova T. D., Prassolov V. S., Lisitsyn N. A. Long non-coding RNA LINC00973 is consistently upregulated in colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. // Biochimie. - **2018**. - V. 151, 67e72.
78. (Q2) Zinovieva O. L., Grineva E. N., Krasnov G. S., Karpov D. S., Zheltukhin A. O., Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Mashkova T. D., Lisitsyn N. A. Treatment of cancer cells with chemotherapeutic drugs results in profound changes in expression of genes encoding aldehyde-metabolizing enzymes. // J Cancer. – **2019**. - V. 10(18), 4256-4263.
79. (Q1) Snezhkina A. V., **Kudryavtseva A. V.**, Kardymon O. L., Savvateeva M. V., Melnikova N. V., Krasnov G. S., Dmitriev A. A. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – **2019**, 6175804.
80. Патент 2545995 – Способ диагностики светлоклеточной почечноклеточной карциномы и набор для его осуществления. **Кудрявцева А. В.**, Кондратьева Т. Т., Дмитриев А. А., Мельникова Н. В., Сенченко В. Н., **2015** год.
81. Патент 2545998 – Способ диагностики светлоклеточной почечноклеточной карциномы и набор для его осуществления. **Кудрявцева А. В.**, Кондратьева Т. Т., Дмитриев А. А., Мельникова Н. В., Сенченко В. Н., Опарина Н. Ю., Сперанская А.С., Садритдинова А. Ф., Снежкина А. В., Дарий М. В., Урошлев Л. А., Степанов О.А., Лакунина В.А., **2015** год.
82. Патент 2586779 – Способ диагностики плоскоклеточного рака легкого и набор для его осуществления. Анедченко Е. А., Дмитриев А. А., **Кудрявцева А. В.**, Краснов Г. С., Кондратьева Т. Т., Лерман М. И., Сенченко В. Н., **2016** год.
83. Патент 2667648 – Аналитическая тест-система по определению чувствительности злокачественной опухоли конкретного пациента к онкологической биотерапии. Липатова А. В., **Кудрявцева А. В.**, Кочетков Д. В., Чумаков П. М., **2018** год.