

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

**До Нгок Хоп**

**ЭКСПРЕССИЯ КИССПЕПТИНОВ В ОПУХОЛЯХ ЛЕГКИХ:  
ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

Научная специальность: 3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация

На соискание ученой степени

Кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки рф,

Доктор медицинских наук, профессор

Кветной Игорь Моисеевич

Санкт-Петербург - 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. РОЛЬ КИССПЕПТИНОВ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ МОЛЕКУЛ В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ ЛЕГКИХ.....	11
1.1. Опухоли легких: определение, этиология, патогенез, классификация.....	11
1.2. Роль кисспептинов в патологии дыхательной системы и развитии рака легкого.....	18
1.2.1. Функциональная характеристика кисспептинов.....	18
1.2.2. Кисспептины при неопластическом фиброзе легких.....	23
1.2.3. Кисспептины при карциноме легкого.....	27
1.3. Кальдесмон: общая характеристика и роль в онкогенезе.....	30
1.3.1. Общая характеристика.....	30
1.3.2. Роль кальдесмона в образовании опухолей и метастазировании.....	36
1.3.3. Кальдесмон и сосудистая инвазия опухолей.....	40
1.3.4. Кальдесмон как возможный опухолевый биомаркер.....	42
1.3.5. Кальдесмон и опухоли легкого.....	43
1.4. Матриксные металлопротеиназы.....	44
1.4.1. Структура и функции матриксных металлопротеиназ.....	44
1.4.2. МТ4-ММП при опухолях различных органов.....	46
1.4.3. МТ4-ММП в процессе образования опухолей легкого.....	49
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1. Характеристика исследуемого материала.....	52
2.1.1. Т – размеры опухоли по классификации TNM.....	52
2.1.2. Система Grading определения уровня дифференцировки опухоли.....	54
2.2. Методы исследования.....	55
2.2.1. Иммуногистохимический метод исследования.....	55

2.2.2. Морфометрия микроскопических изображений .....	57
2.2.3. Методы статистической обработки .....	58
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	61
3.1. Анализ общебиологических и гендерных параметров опухолей.....	61
3.2. Анализ гендерных особенностей пролиферативной активности и иммунофенотипов опухолевых клеток.....	65
3.3. Анализ прогностической значимости экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним молекул в опухолях легких.....	66
3.4. Оценка прогноза метастазирования карцином легкого.....	77
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	91
ВЫВОДЫ.....	94
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	95
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И СИМВОЛОВ .....	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	98

## ВВЕДЕНИЕ

В легком развиваются разнообразные опухоли - как доброкачественные, так и злокачественные.

Доброкачественные опухоли легких, к которым относится аденома и им родственные, составляют около 10% от всех доброкачественных и злокачественных опухолей [17].

Примерно на одной из 500 рентгенограмм грудной клетки случайно обнаруживается одиночный легочный узел, и почти половина этих поражений легких вызвана опухолью. Большинство из них являются злокачественными новообразованиями, чаще всего первичным раком легких, за которым следуют метастазы внелегочных первичных карцином [20]. Тщательная диагностика одиночных легочных узлов, включая гистологическую диагностику, является обязательной для адекватного ведения и лечения пациентов с поражениями легких.

Несмотря на все недавние усовершенствования методов лечения, карцинома (рак) легких по-прежнему остается основной причиной заболеваемости и смертности среди злокачественных заболеваний во всем мире. Карцинома легкого является одним из наиболее частых онкологических заболеваний, что составляет около 95% среди опухолей легких с плохим прогностическим исходом, и самой высоко вероятной причиной онкологической смертности в России и во всем мире [80, 99].

Прогноз у пациентов с карциномой легкого в большинстве случаев неблагоприятный и 5-летняя выживаемость, составляющая всего 14%, делает рак легких первостепенной причиной смерти от рака. Из-за плохого прогноза профилактика и ранняя диагностика рака легких имеют решающее значение для улучшения результатов

лечения пациентов. Хорошее знание эпидемиологии и этиологии опухолей легких является ключом к профилактическим мерам и выявлению лиц с повышенным риском развития рака легких.

В 2018 году первично диагностировано около 2,1 миллиона новых пациентов с раком легких [53, 99, 104]. Ежегодно более 1,6 миллиона человек в мире умирает от рака легких и его осложнений [40, 93]. В 2016 г. смертность от рака легкого в России составила 19,94‰.

В последние годы знания о разнообразной биологии опухолей значительно расширились, благодаря использованию иммуногистохимических (иммуноцитохимических) методов (ИГХ/ИЦХ-методов) и молекулярной биологии [19]. Эти методы способствовали улучшению качественной и количественной характеристике гетерогенно дифференцированных опухолей легких (например, нейроэндокринных/бластоматоидных участков и т.д.). Гетерогенность опухолей подчеркивается результатами, полученными с помощью молекулярно-генетических методов [19, 27].

Использование ИГХ-метода для определения иммунофенотипа опухолевых клеток значительно оптимизирует дифференциально-диагностический поиск, позволяет выявить патогенетические механизмы опухолевой прогрессии и молекулярные мишени для выбора современной и наиболее эффективной терапии [7].

В последние годы наблюдается рост выполняемых ИГХ-исследований, в ходе которых проводится определение экспрессии потенциальных маркеров злокачественности. Значимыми маркерами для первичной диагностики опухолей легких являются: СК7, СК20, тиреоидный фактор транскрипции ТТФ-1, хромогранин А, синаптофизин, CD56; белки сурфактанта; p63, СК5/6 и кисспептины [103, 104].

Интерес представляют кисспептины (КР), которые относятся к группе пептидов, произошедших при активации гена KISS-1 [5, 15]. Кисспептины и их рецептор (KISS1R) играют важную роль во многих физиологических процессах со стороны репродуктивной системы, сосудистой системы, интегрального метаболизма и других [18].

Сигнальная система KISS1/KISS1R может служить регулятором метастазирования опухолей и является потенциальным прогностическим маркером опухолевых процессов [14]. Подавление экспрессии KISS1 описано также при прогрессировании карцином легкого и их метастазировании. Однако, пока кисспептинам и их роли в патологии дыхательной системы (в частности, опухолей легких) посвящено малое количество работ.

В этой связи актуальность выбранной темы исследования состоит в проведении углубленного изучения экспрессии кисспептинов и ассоциированных с ним молекул в карциномах легкого для оценки диагностического и прогностического значения кисспептинов при опухолевом росте.

#### **Цель исследования.**

Целью исследования является определение диагностического и прогностического значения кисспептинов в карциномах легких различной степени дифференцировки.

Для достижения указанной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Установить корреляции между степенью дифференцировки карцином легкого, полом, возрастом пациентов и вторичными изменениями в новообразованиях;
2. Установить корреляции между уровнем экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул – кальдесмона и

матриксной металлопротеиназы типа 4 (ММП-4) в карциномах легких;

3. Выявить корреляции между экспрессией кисспептина-1, кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких и степенью их дифференцировки;
4. Определить связь между метастазированием и экспрессией кисспептина-1, кальдесмона и ММП-4 в опухолях легких;
5. Оценить возможность использования кисспептина-1 как биомаркера для прогноза метастазирования карцином легкого.

### **Научная новизна.**

Впервые установлены корреляции между степенью дифференцировки опухолей, полом, возрастом пациентов и вторичными изменениями в новообразованиях.

Определены корреляции между уровнем экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул – кальдесмона и матриксной металлопротеиназы типа 4 (ММП-4).

Выявлены корреляции между экспрессией кисспептина-1, кальдесмона и ММП-4 в опухолях и степенью их дифференцировки.

Определена связь между метастазированием и экспрессией кисспептина, кальдесмона и ММП-4 в опухолях легких.

Разработана возможность использования кисспептина-1 как биомаркера для прогноза метастазирования карцином легкого.

Установленные корреляции экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул со степенью дифференцировки карцином легкого позволяют использовать их в качестве биомаркеров для оценки прогрессии опухоли.

### **Практическая значимость.**

Полученные результаты позволили разработать алгоритм использования показателей экспрессии кисспептина-1 и

ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4) в карциномах легкого в качестве маркеров прогрессии злокачественных опухолей.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Между степенью дифференцировки карцином легкого, полом, возрастом пациентов и вторичными изменениями в новообразованиях существуют достоверные корреляции.

2. Установлены корреляции между уровнем экспрессии киспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул – кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких.

3. Выявлены корреляции между экспрессией киспептина-1, кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких и степенью дифференцировки опухолей. Показано монотонное возрастание экспрессии киспептина-1 и кальдесмона и монотонное снижение ММП-4 при переходе от низкой к высокой степени дифференцировки карцином.

4. Определена связь между метастазированием и экспрессией киспептина, кальдесмона и ММП-4 в опухолях легких. Установлена обратная взаимосвязь между наличием метастазов и показателями экспрессии киспептина-1, кальдесмона, а также прямая взаимосвязь между наличием метастазов и показателями экспрессии ММП-4.

5. Киспептин-1 может рассматриваться как информативный биомаркер для прогноза метастазирования карцином легкого.

6. Разработан алгоритм использования показателей экспрессии киспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4) в карциномах легкого в качестве маркеров прогрессии злокачественных опухолей.



### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность результатов исследования определяется репрезентативным объемом выборки, использованием современных методов и применением адекватных приемов статистической обработки. Результаты диссертационного исследования неоднократно докладывались на международных и российских научных конференциях.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ и 1 статья в журнале, входящем в базы данных системы SCOPUS и WEB OF SCIENCE.

Результаты диссертационного исследования доложены на VI Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург, 2022.

### **Внедрение результатов исследования.**

Результаты диссертации внедрены в научно-клиническую и педагогическую практику ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ; АННО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» и кафедры патологии медицинского университета Санкт-Петербургского государственного университета.

### **Место выполнения работы и личный вклад соискателя.**

Диссертационная работа выполнялась в 2020-2023 годах на научно-образовательной базе Санкт-Петербургского государственного университета – ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» (Отдел трансляционной биомедицины) в рамках Государственного задания № 056-00013-18-00 «Сигнальные

молекулы как биомаркеры социально-значимых заболеваний дыхательной системы». Проведение работы в рамках государственного задания одобрено решением Этического Комитета ФГБУ «СПБ НИИФ» № 93.1 от 23.11.2022 года.

Автором выполнен аналитический обзор литературы, сбор и систематизация образцов опухолей, определен дизайн исследования. Проведен анализ микроскопических изображений с автоматическим подсчетом площади экспрессии сигнальных молекул, проведена математико-статистическая обработка полученных данных и осуществлена интерпретация полученных результатов.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, указателя использованной литературы. Объем диссертации составляет 111 страниц, включает в себя 15 таблиц и 19 рисунков. Указатель литературы содержит 122 источника, из них отечественных источников - 23, зарубежных - 99.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.**

### **РОЛЬ КИССПЕПТИНОВ И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ МОЛЕКУЛ В РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ ЛЕГКИХ**

#### **1.1. Опухоли легких: определение, этиология, патогенез, классификация**

Различают доброкачественные и злокачественные опухоли легких. Доброкачественные опухоли легких, к которым относятся аденомы и им родственные новообразования, составляют от 2% до 12% всех новообразований легких [17].

Карцинома или рак легкого (РЛ) является одним из наиболее частых онкологических заболеваний и самой высоко вероятной причиной онкологической смертности в России и во всем мире [80, 99].

В 2016 г. в РФ в структуре онкологической заболеваемости РЛ занимал 3-е место (10,1%) среди обоих полов, 1-е место среди мужчин (17,6%) и 10-е среди женщин (3,8%) [9].

Существуют разные факторы риска для развития рака легкого, в том числе: генетические, профессиональные, пол, возраст и другие. Однако, табакокурение является основной причиной всех основных гистологических типов рака легки [71]. Частота развития РЛ у курящих в 5-7 раз выше, чем у некурящих.

Пятилетняя выживаемость пациентов рака легкого колеблется от 4% до 17%. Основным фактором, определяющим прогноз выживаемость каждого конкретного пациента, считается стадия заболевания [10]. Выявление РЛ на I—II стадии способствует увеличению контингента пациентов, состоящих на учете 5 лет и более, и снижению смертности [9].

Рак легкого, который характеризуется достаточно скрытым течением и ранним появлением метастазов, часто диагностируется случайно или на поздней стадии, у большинства пациентов только после медицинского осмотра.

В настоящее время у большинства больных (60-80%) с вновь выявленным РЛ в России заболевание диагностируется на III-IV стадии [13].

РЛ — это сложное заболевание, состоящее из различных гистологических и молекулярных типов, имеющих клиническое значение. Развитие крупномасштабного молекулярного профилирования помогло выявить новые молекулярные мишени, которые могут быть применены для лечения конкретных пациентов с РЛ, и помогло изменить патологическую классификацию рака легких.

Новые направления включают революцию в иммунотерапии, которая открыла перспективы для новых возможностей в лечении рака, а также для пересмотра классификации множественных опухолей, включая РЛ [71].

Однако, несмотря на прогресс в области молекулярной медицины, в 2016 г. показатель активного выявления РЛ по РФ составил всего 23,3%. Эти обстоятельства негативно влияют на процесс лечения и определяют неблагоприятный прогноз течения опухолевого процесса у большого числа пациентов.

РЛ представляет собой гетерогенное заболевание с широким спектром клинико-патологических особенностей [99, 100].

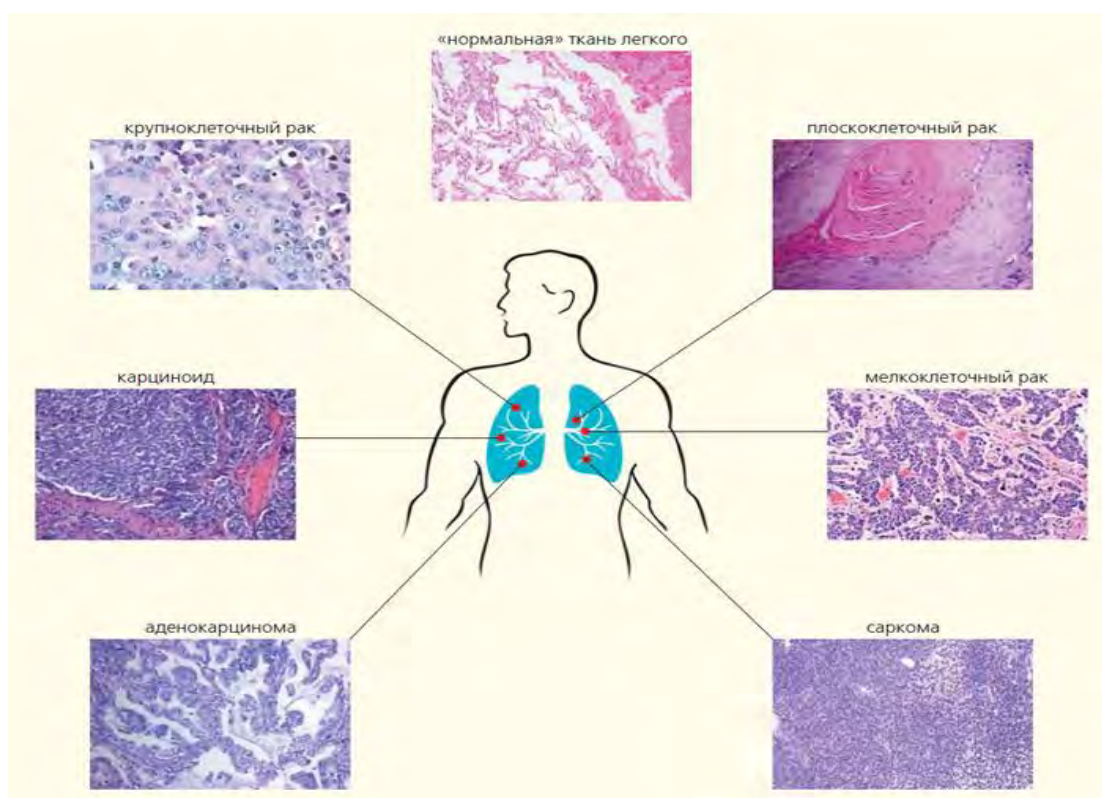


Рисунок 1. Международная гистологическая классификация рака легкого [5].

В 2021 году была опубликована «Классификация опухолей грудной клетки» Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Предыдущие издания ВОЗ были опубликованы в 1967 и 1981 годах исключительно в отношении легких, далее в 1999 году классификация была разделена на отдельно по легким и плевре, а в 2004 и 2015 годах – уже по легким, плевре, тимусе и сердцу. Классификация видоизменялась в основном благодаря значительному прогрессу в понимании генетики и молекулярно-таргетной терапии. Благодаря внедрению иммуногистохимии и молекулярного тестирования во всю классификацию, многие из более сложных подходов к патологической диагностике привели к более точной патологической и генетической классификации опухолей легких, что позволило разработать более эффективные терапевтические стратегии.

Принципы классификации РЛ по-прежнему основаны на использовании сначала морфологических критериев, дополненных иммуногистохимическими параметрами, а затем молекулярных методов.

В 2015 году особое внимание уделялось использованию иммуногистохимии для повышения точности классификации.

В 2021 году ВОЗ уделила больше внимания достижениям в области молекулярной патологии всех типов опухолей. Отдельные молекулярные аномалии являются частью диагностических критериев для некоторых более редких опухолей, например миксоидной саркомы легкого с экспрессией EWSR1-CREB1, но, хотя многие молекулярные аномалии пока не влияют на классификацию конкретных подтипов опухоли, они могут повлиять на тактику ведения пациента.

По гистологической классификации (рис. 1) различают следующие типы РЛ:

1. Мелкоклеточный рак. Редко встречаемый вид, который составляет около 13% РЛ. Имеет неблагоприятные прогнозы с быстрым прогрессированием и развитием метастазов.

2. Немелкоклеточный рак (НМРЛ). Самая распространенная форма РЛ, она составляет более 80 процентов и развивается не так стремительно как мелкоклеточная форма, однако все равно считается, что имеет неблагоприятных прогноз [99].

НМРЛ имеет разное расположение, а также в зависимости от типа клеток разделяется на:

- Аденокарцинома. Аденокарцинома развивается из железистого эпителия легких, в настоящее время является основным гистологическим типом, на ее долю приходится почти половина всех случаев. ВОЗ в 2015 году приняла

классификацию, разработанную Международной ассоциацией по изучению РЛ, Американским торакальным обществом и Европейским респираторным обществом. Эта новая классификация аденокарциномы вобрала в себя последние достижения в области радиологии, молекулярной биологии и онкологии, предоставляя однозначные диагностические критерии и терминологию. Для резекционных образцов были определены новые образования, такие как аденокарцинома *in situ* и минимально инвазивная аденокарцинома, для обозначения аденокарцином, в основном немучинозных и размером  $\leq 3$  см, либо с чисто чешуйчатым ростом, либо с преобладающим чешуйчатым ростом с инвазией  $\leq 5$  мм, соответственно. Для инвазивной аденокарциномы в новой классификации введено гистологическое подтипирование в соответствии с преобладающим типом роста опухолевых клеток: липидная (ранее немучинозная бронхиолоальвеолярная аденокарцинома), ацинарная, папиллярная, микропапиллярная и солидная. Следует отметить, что микропапиллярный рисунок - это совершенно новый гистологический подтип. Кроме того, распознаются четыре варианта инвазивной аденокарциномы, а именно инвазивная муцинозная (ранее муцинозная бронхиолоальвеолярная аденокарцинома), коллоидная, фетальная и кишечная. Имеет мишени для таргетного лечения, которое направлено на блокировку процесса синтеза эпидермального фактора роста (EGFR). Препараты – ингибиторы тирозинкиназы.

- Плоскоклеточный РЛ. Плоскоклеточный РЛ связан с высокой смертностью и отсутствием методов лечения, специфичных для этого заболевания. Хотя в плоскоклеточном РЛ присутствуют повторяющиеся молекулярные aberrации, усилия по разработке таргетной терапии против рецепторных тирозинкиназ, сигнальной трансдукции и контрольных точек клеточного цикла при плоскоклеточном РЛ столкнулись со значительными трудностями. Современный терапевтический ландшафт сосредоточен на эпигенетической терапии для модуляции экспрессии зависимых от происхождения путей выживания и не поддающихся лечению онкогенов. Другим важным терапевтическим подходом является использование метаболических взаимосвязей, уникальных для плоскоклеточного РЛ. Эти новые методы лечения могут сочетаться с ингибиторами иммунных контрольных точек. Например, признание того, что изменения в системе KEAP1-NFE2L2 при плоскоклеточном РЛ влияют на противоопухолевые иммунные реакции, создало уникальные возможности для целенаправленных, метаболических и иммунных комбинаций.
- Крупноклеточный РЛ. Его название обусловлено формой и размером клеток. Крупноклеточный РЛ - редкий подтип злокачественной опухоли легких. Сообщалось, что частота встречаемости крупноклеточного РЛ составляет 0,3-3%. Хотя крупноклеточный РЛ классифицируется как НМРЛ, он более агрессивен и злокачественен, чем другие виды НМРЛ, и его биологическое поведение аналогично поведению мелкоклеточного РЛ. Клинические проявления



этого типа карциномы неспецифичны. Визуализируемые проявления опухолей часто локализуются на периферии и в верхних долях, а увеличение средостенных или подкожных лимфатических узлов является обычным явлением. Диагноз в основном основывается по гистологическим признакам и иммуногистохимическим критериям. Специфические нейроэндокринные маркеры, такие как хромогранин А (CgA), синаптофизин (Syn) и CD56, обычно диффузно положительны при крупноклеточном РЛ, также было обнаружено, что ассоциированный с инсулиновой белок (INSM1) и высокий уровень Ki-67 могут быть предикторами развития и маркерами диагностики. Большое количество дифференциальных диагнозов также увеличивает сложность правильной диагностики крупноклеточного РЛ. Распространение молекулярного типирования крупноклеточного РЛ в последние годы может быть полезным для диагностики и последующего лечения.

- РЛ неизвестного гистологического происхождения и неклассифицируемой дифференцировки клеток составляет менее 5% случаев НМРЛ.

По современным представлениям клетки эпителиальных злокачественных опухолей (карцином) вырабатывают многочисленные сигнальные молекулы [2,7], экспрессия которых является ключевым звеном в механизме прогрессии опухолей и во многом определяет прогноз развития злокачественного новообразования в каждом конкретном случае.

В этой связи изучение молекулярных фенотипов злокачественных опухолей может явиться перспективным

направлением в персонализированной медицине для выбора оптимальной тактики лечения новообразований и определения их прогноза у конкретного пациента.

Среди большого числа сигнальных молекул, продукция которых описана в нормальной и опухолевой легочной ткани, большой интерес представляет семейство белков – кисспептинов и ассоциированных по биологическим эффектам с ними таких молекул как кальдесмон и металлопротеиназы.

Роль этих молекул в механизмах опухолевой прогрессии изучена пока недостаточно.

## **1.2. Роль кисспептинов в патологии дыхательной системы и развитии рака легкого**

### **1.2.1 Функциональная характеристика кисспептинов**

Кисспептин (КП) - пептид, играющий важную роль в функционировании гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (ГГС). Кисспептин вырабатывается двумя основными популяциями нейронов, расположенных в гипоталамусе, ростральной перивентрикулярной области третьего желудочка и дугообразном ядре. Эти нейроны проецируются на нейроны гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ), активируют их (действуя через рецептор кисспептина, KISS1R) в гипоталамусе и стимулируют секрецию ГнРГ.

Гонадные половые стероиды стимулируют кисспептиновые нейроны в области третьего желудочка, но ингибируют кисспептиновые нейроны в дугообразном ядре, что является основным механизмом положительной и отрицательной обратной связи соответственно, и в настоящее время общепризнано, что

кисспептиновые нейроны дугообразного ядра действуют как генератор импульсов ГнРГ.

Из-за глубокого влияния кисспептина на ось ГГС, в центре внимания недавних исследований были афферентные сигналы, поступающие к кисспептиновым нейронам, и одной из конкретных областей интереса был энергетический баланс, который, как полагают, способствует таким эффектам, как подавление фертильности у людей с недостаточным питанием или, наоборот, с ожирением.

С другой стороны, накапливаются доказательства прямой роли кисспептина в регуляции энергетического баланса и метаболизма. Экспериментальные данные показали, что у мышей с ингибированным KISS1R, отмечалось ожирение и снижение энергозатрат. Механизмы, лежащие в основе этих наблюдений, в настоящее время неизвестны, однако, KISS1R экспрессируется в жировой ткани. Отдельные исследования посвящены влиянию передачи сигналов кисспептинов на поведение, поскольку появляются клинические доказательства того, что кисспептин влияет на сексуальное поведение [5, 15].

Экспрессия кисспептинов происходит при активации гена KISS-1. Первоначально кисспептины были названы метастатинами, так как было обнаружено их свойство блокировать образование опухолевых узлов в легких мышей, которым прививали клетки меланомы B16BL6 или карциномы легких Льюиса [15].

Кисспептин, продукт гена KiSS-1, и его рецептор, связанный с G-белком GPR54 (рис. 2), играют главную роль в периоде полового созревания и фертильности. Этот пептид из 54 аминокислот, известный также как антиметастатический, из-за своей способности подавлять метастазы, также играет активную роль при опухолях. Различные короткие пептиды, которые объединены под названием

кисспептины, имеют общий С – концевой лиганд, который связывается с KISS1R. Ген, кодирующий КП, расположен на длинном плече хромосомы 1 (1q32) и состоит из четырех экзонов [26].

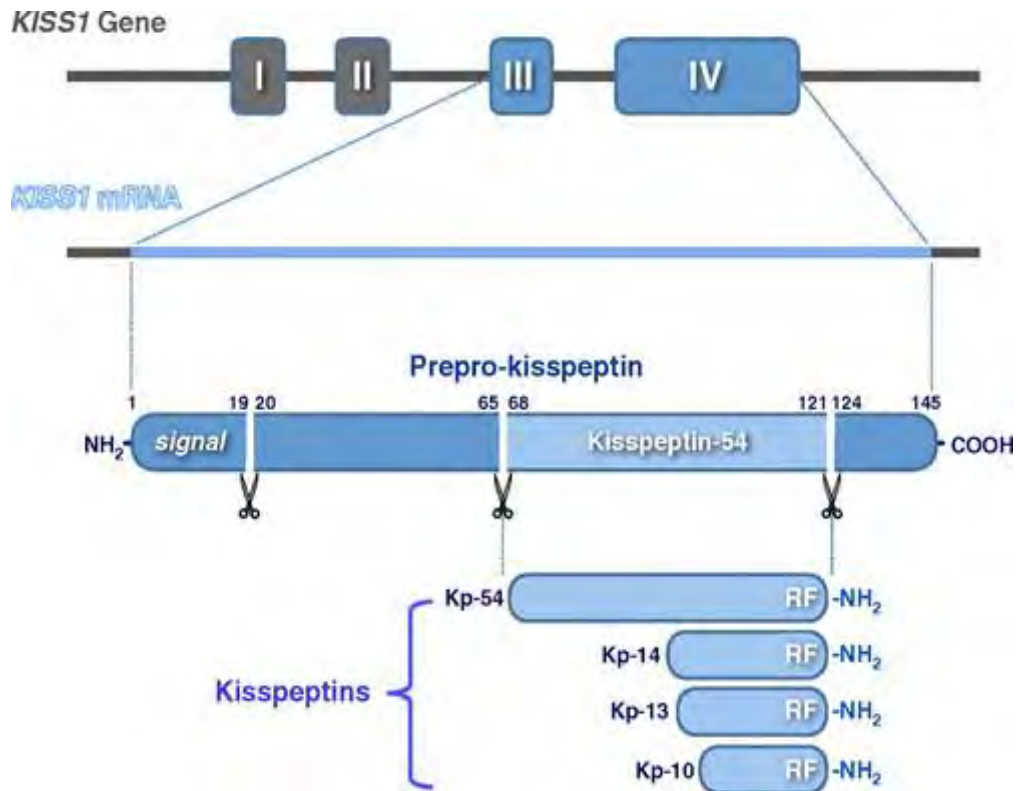


Рисунок 2. Экспрессия и сигнальный путь кисспептинов [23].

КП были обнаружены в 1990-х годах Lee и другими [68]. КП признаны мощными позитивными регуляторами репродуктивной нейроэндокринной оси у млекопитающих, впервые сообщалось о роли KISS1 в подавлении метастазирования при меланоме.

С тех пор стало очевидно, что KISS1, КП и KISS1R регулируют развитие и прогрессирование нескольких видов рака, но интересно, что в то время как эти молекулы действуют как супрессоры онкогенеза и метастазирования при многих видах рака, то при раке молочной железы и печени они функционируют как промоторы.

Учитывая их роль, KISS1, КП и KISS1R представляют собой важные молекулы при разработке новых методов лечения и/или в качестве прогностических маркеров при лечении рака. Однако для достижения этой цели требуется детальное понимание взаимосвязи между этими молекулами и различными видами рака. Новое направление, вытекающее из рассмотренных исследований, заключается в том, что взаимосвязь между этими молекулами и конкретным видом рака сложна и зависит от многих факторов, таких как микросреда и статус стероидных рецепторов раковой клетки [68].

КП включают в себя общий аргинин-фениламин на С-конце. Основные свойства КП зависят от аминокислотных концевых остатков [46].

КП - нейропептиды, локализованные в преоптической зоне и аркуатном ядре гипоталамуса. Кисспептин, продуцируемый в головном мозге не попадает в системный кровоток, а проявляет свое биологическое действие на уровне гипоталамо-гипофизарной системы [48].

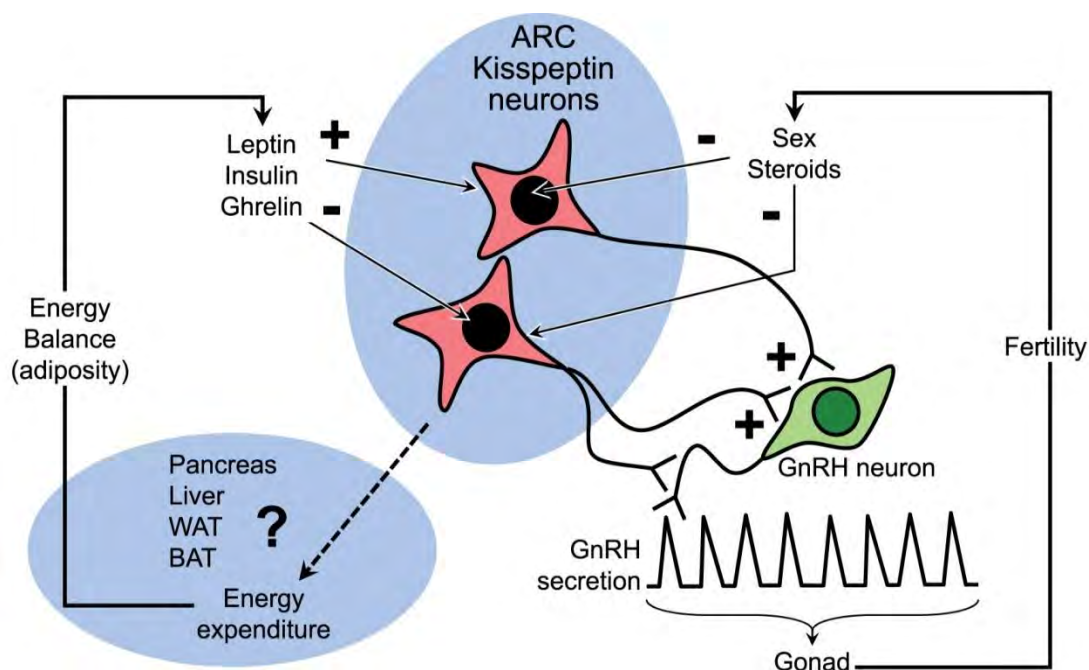


Рисунок 3. Синтез и мишени кисспептинов в организме человека [26].

Основным и наиболее распространенным типом КП является кисспептин-1 (КП-1).

Кисспептин - это гипоталамический нейропептид, который действует через гипоталамус, стимулируя секрецию гипоталамического Гн-РГ и последующее высвобождение гонадотропина (рис. 3) [16].

В здоровом состоянии КП-1 индуцирует нормальное половое созревание и модулирует овуляцию у здоровых женщин. Экспрессия КП-1 в гипоталамусе снижена при нескольких функциональных нарушениях репродуктивной функции. Таким образом, лечение таких состояний кисспептином является концептуально привлекательным.

Недавние исследования продемонстрировали, что КП-1 может индуцировать более физиологичную степень созревания яйцеклеток во время процедуры экстракорпорального оплодотворения, что может снизить риск потенциально опасных для жизни осложнений, таких как синдром гиперстимуляции яичников, наблюдаемый при применении хорионического гонадотропина человека. Кроме того, хроническое применение КП-1 потенциально может восстановить репродуктивное здоровье у женщин с гипоталамической аменореей, лечить нарушение гипосексуального влечения у здоровых в остальном мужчин и имеет потенциальные показания при синдроме поликистозных яичников, остеопорозе и жировой болезни печени, связанной с метаболической дисфункцией [55]. Также считается, что во время беременности основным регулятором секреции гонадотропин-рилизинг-гормона (Гн-РГ) является именно КП-1 [5, 55].

Таким образом, KISS1, КП, KISS1R принимают активное регуляторное участие в функционировании многих важных органов и систем [59, 90]. Недавно появились данные, свидетельствующие о том, что КП может играть дополнительную роль в регуляции

гомеостаза глюкозы. Были опубликованы противоречивые сообщения о влиянии КП на секрецию инсулина в экспериментальных моделях, которые не могут быть полностью объяснены различными изоформами киспептина и диапазоном доз киспептина, использованных в этих исследованиях. Исследования метаболизма глюкозы у людей продемонстрировали связь между уровнями циркулирующего киспептина и показателями секреции инсулина и инсулинорезистентности. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизмов, лежащих в основе воздействия КП на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы, и определения терапевтического потенциала агониста рецепторов КП при лечении нарушений гомеостаза глюкозы [90].

### **1.2.2. Киспептины при неопластическом фиброзе легких**

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) является прототипом хронического, прогрессирующего и фиброзно-воспалительного заболевания легких. Здоровая ткань заменяется измененным внеклеточным матриксом, а альвеолярная архитектура разрушается, что приводит к снижению эластичности легких, нарушению газообмена и, в конечном счете, к дыхательной недостаточности и смерти. Менее чем за десятилетие понимание патогенеза и лечения этого заболевания претерпело изменения и были одобрены две терапевтические тактики для лечения этого заболевания. Современные исследования способствовали более детальному пониманию механизмов фиброза легких, что дает надежду на то, что аналогичные подходы изменят ведение пациентов с другими прогрессирующими фиброзными заболеваниями легких.

Причинами развития ИЛФ может быть перенесенное воспаление легких, либо осложнение после перенесенной операции по поводу новообразований легких.

ИЛФ - хроническое прогрессирующее заболевание неизвестной причины, характеризующееся непрекращающимся рубцеванием легочной паренхимы, приводящим к снижению качества жизни и более ранней смертности. ИЛФ – возраст-ассоциированное заболевание, и в связи со старением населения во всем мире ожидается, что социально-экономическое бремя ИЛФ в будущем будет неуклонно возрастать.

Механизмы фиброза при ИЛФ остаются неясными, при этом преобладают концепции патогенеза заболевания, включающие повторяющиеся микротравмы генетически предрасположенного альвеолярного эпителия, за которыми следует аберрантный репаративный ответ, характеризующийся избыточным отложением коллагена. Первый ряд терапевтической тактики – применение глюкокортикоидных гормонов и цитостатиков, однако при этом возникает много побочных эффектов и нет доказанной базы эффективности. Существует растущий ассортимент вариантов лечения ИЛФ - множество профибротических цитокинов и факторов роста, участвующих в патогенезе заболевания, однако такая тактика может потребовать сочетания терапевтических стратегий с различными механизмами действия [67].

Развитие, наличие и прогрессирование ИЛФ приводит к развитию аденокарциномы, плоскоклеточного либо мелкоклеточного РЛ примерно у 15% пациентов [60, 121]. Патогенетически имеются общие механизмы развития данных заболеваний, однако этиология до сих пор до конца невыяснена. Сочетание ИЛФ и РЛ имеет крайне неблагоприятный прогноз [35].



Считается, что биологические процессы, лежащие в основе ИЛФ, отражают aberrантную репаративную реакцию на повторяющиеся повреждения альвеолярного эпителия у генетически восприимчивого стареющего индивидуума, хотя остается много вопросов о том, как определить восприимчивость к данному заболеванию [50].

Текущие усилия здравоохранения направлены на раннее выявление ИЛФ, потенциально опираясь на комбинации биомаркеров, которые включают циркулирующие факторы, демографические данные и данные компьютерной визуализации [67].

Существующие терапевтические подходы неэффективно нацелены на метастатический рак, часто ограничиваясь их неспособностью устранить уже возникшие непролиферативные, остановленные в росте или устойчивые к терапии опухолевые клетки. Разработка эффективных подходов, нацеленных на метастатические опухолевые клетки, была в центре внимания онкологов на протяжении десятилетий. Однако, прогресс был ограничен из-за ограниченного понимания процесса «спящей» опухоли. Исследования состояния процесса «спящих» опухолей привели к выявлению нескольких регуляторов. Одними из них являются КП, а именно, KISS1 - ген-супрессор метастазирования, который подавляет метастазирование, удерживая опухолевые клетки в состоянии покоя в местах эктопии. Обсуждается его потенциальное применение в качестве терапевтического средства против метастатического рака путем уничтожения покоящихся клеток или индуцирования длительной ремиссии в опухолевых клетках [31].

Все нативные функциональные КП человека (кисспептин-54, кисспептин-14 и кисспептин-13) содержат 10 аминокислот кисспептина-10 на своем С-конце. Однако они быстро инактивируются матриксными металлопротеиназами (ММП) путем

расщепления пептидной связи между глицином и лейцином, что ограничивает их клиническое применение. Ведутся разработки ММР-резистентных аналогов кисспептинов, что может обеспечить лучшие терапевтические результаты в отношении фиброза, воспаления и развития онкологического процесса [92].

Принимая во внимание все вышеизложенное, Lei и соавт. провели серию экспериментов для выяснения обладает ли кисспептин-13 (КП-13) антифибротическими свойствами.

Экспериментально показано, что КП -13 могут снижать развития воспаления и обладают антифибротическими свойствами у мышей с фиброзом легких, возникшим от применения блеомицина.

Блеомицины часто применяются в терапии онкологических заболеваний, показывают хорошие результаты и вызывают незначительное угнетение костного мозга, но основным побочным эффектом является легочная токсичность. Механизмы клеточной токсичности хорошо описаны на основе экспериментов *in vitro* с ДНК. Молекула блеомицина состоит из двух основных структурных компонентов: битиазольного компонента, который частично встраивается в спираль ДНК, разделяя нити, а также пиримидиновой и имидазольной структур.

Блеомицин способен вызывать повреждение клеток независимо от его воздействия на ДНК путем индукции перекисного окисления липидов. Именно это свойство может объяснить отрицательное воспалительное действие блеомицина на легкие. Повреждение легких, наблюдаемое после применения блеомицина, включает в себя интерстициальный отек с притоком воспалительных и иммунных клеток. Это может привести к развитию легочного фиброза, характеризующегося усиленной выработкой и отложением коллагена и других компонентов матрикса. В этом участвуют несколько полипептидных медиаторов, способных стимулировать репликацию

фибробластов или избыточное отложение коллагена, но точная роль этих медиаторов в развитии фиброза, индуцированном блеомицином, еще предстоит исследовать. Современная терапия повреждения легких, вызванного блеомицином, неадекватна, чаще всего используются кортикостероиды. Учитывая механизм действия, описанный выше, антиоксиданты и хелаторы железа могут быть терапевтическими точками профилактики развития осложнений применения блеомицина. Хотя исследования на сегодняшний день носят неоднозначный характер и нет достаточных доказательств для их клинического применения. В настоящее время разрабатываются новые лекарственные препараты, и есть надежда, что они могут оказаться более полезными. Одним из них является КП-13, который экспериментально доказал свою эффективность в качестве препарата, обладающего антифибротическим действием. Также в данном исследовании было показано, что при ингибировании КП-13, после применения блеомицина, развивался фиброз легких [69]. Поэтому применение КП-13 в качестве антифибротического средства имеет большие перспективы в терапии фиброза легких.

### **1.2.3. Киспептины при карциноме легкого**

Рак легких является ведущей причиной смертности от рака в мире. Существуют различные методы диагностики заболевания, но часто РЛ выявляется только на поздних стадиях. Лечение определяется подтипом и стадией рака. Существует несколько персонализированных методов лечения, которых не существовало всего несколько лет назад. Однако, несмотря на прогресс в лучевой и химиотерапии, РЛ до сих пор занимает лидирующие позиции среди причин смертности. Поэтому поиск новых способов лечения до сих пор является актуальным.

Как было сказано выше, киспептины участвуют в регуляции активности коллагеназы, которая разрушает внеклеточный матрикс, что важно для метастазирования. Экспрессия и функция KISS1 являются тканеспецифичными [84, 117].

Ikeguchi et al. сообщили, что экспрессия KISS1 при раке пищевода с метастазами в лимфатические узлы была значительно ниже, чем без метастазов, предполагая, что отсутствие KISS1 была тесно связано с метастазами в лимфатические узлы при раке пищевода [56].

Ringel et al. пришли к аналогичному выводу при исследовании рака щитовидной железы [87]. Напротив, экспрессия KISS1 повышена у пациентов с раком молочной железы с агрессивными опухолями и высокой смертностью [72].

Установлено, что металлопротеиназа-9 (ММП-9) оказывает ангиогенный эффект и способна за счет этого усилить прогрессирование опухолевого процесса [120]. Роль киспептина в этих процессах до конца не выяснена. Ученые, во главе с Zheng исследовали экспрессию MMP-9 и KISS1 в 85 случаях НМРЛ и метастазах лимфатических узлов, чтобы определить взаимосвязь между уровнем их экспрессии и метастазированием, а также выживаемостью пациентов.

В исследовании участвовали пациенты от 41 до 80 лет, средний возраст на момент операции - 57 лет. По полу группа делилась следующим образом: 68 мужчин и 17 женщин. Метастазы в лимфатические узлы встречались у 66%. При патоморфологическом анализе, установлено, что 60 случаев были классифицированы как плоскоклеточный рак, 22 - аденокарцинома, а остальные 3 случая - железисто-плоскоклеточная карцинома. По гистологическому классу 7 случаев были хорошо дифференцированы, 47 случаев - умеренно дифференцированы и 31 случай - плохо дифференцированы. Изучено

26 случаев заболевания I стадии, 40 случаев заболевания II стадии, 17 случаев заболевания III стадии и 2 случая заболевания IV стадии.

При анализе экспрессии мРНК и белка KISS1 не было выявлено статистически достоверных корреляций с возрастом или полом пациентов, размером опухоли, гистологическим подтипом опухоли или гистологическим классом ( $p > 0,05$ ).

Зарегистрирована максимальная экспрессия KISS1 в начале процесса, тогда как на поздних стадиях прогрессирования опухоли она снижалась. На синтез KISS1 влияло и наличие процесса метастазирования. Так, при отсутствии данного процесса - синтез KISS1 был выше, чем при наличии опухоли. Начальная стадия опухолевого процесса также характеризовалась высоким синтезом KISS 1. Тогда как для MMP-9, наоборот, экспрессия при НМРЛ с метастазами была выше, также повышенная экспрессия наблюдалась при прогрессировании заболевания по сравнению с начальными стадиями (I-II).

Пятилетняя выживаемость была самой высокой (20,9%) у пациентов с начальными стадиями (I-II) НМРЛ с высокой экспрессией KISS1, тогда как пятилетняя выживаемость составила всего 2,4% у пациентов с более поздними стадиями опухоли (III-IV) и пониженной экспрессии KISS1. Разница в 5-летней выживаемости между этими двумя группами была статистически значимой ( $p < 0,01$ ).

Эти данные отражают актуальность изучения KISS1 и MMP-9 как возможных молекулярных факторов для определения стадии опухолевого процесса, а также наличия метастатического процесса и прогрессирования, что крайне важно для оценки прогноза при наличии НМРЛ. Точный механизм подавления метастазирования опухолей кисспептином до сих пор не выяснен.

Утрата гетерозиготности (LOH) в области хромосомы 6q16.3-q23 значительно коррелировала с подавлением KISS1 экспрессии.

Интересно, что утрата гетерозиготности в хромосоме 6q16.3 была идентифицирована в некоторых случаях немелкоклеточного рака легких, предполагая аналогичную роль KISS1 в этом патологическом процессе [95].

В исследованиях по опухолям других локализаций были получены аналогичные результаты, так Dhar et al. обнаружили, что опухоли желудка с низкой экспрессией KISS1 часто имели метастазы и рецидивы опухолей [39]. Кроме того, обнаружено, что у пациентов с опухолями с низкой экспрессией KISS1 выживаемость значительно хуже. В другом исследовании высокая экспрессия KISS1 оказалась независимым прогностическим маркером отсутствия рецидивов и общей выживаемости у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [61]. Таким образом, кисспептин можно рассматривать как возможный прогностический маркер для НМРЛ.

Ряд сигнальных молекул, экспрессируемых в ткани легких каскадно связаны с выработкой кисспептинов. В первую очередь, это кальдесмон и матриксная металлопротеиназа типа 4 (ММП-4). Поэтому важно изучить их взаимосвязь с экспрессией кисспептина в легких при злокачественном росте.

### **1.3. Кальдесмон: общая характеристика и роль в онкогенезе**

#### **1.3.1. Общая характеристика**

Термостабильный мультидоменный белок, у которого относительная молекулярная масса около 120–150 кДа, обнаруживается в гладких мышцах, внутренних органах и немышечных клетках многих позвоночных [8, 24, 74]. Кальдесмон, актин-связывающий белок, обеспечивает ингибирование связывания

миозина с актином и регулирует сокращение и расслабление гладкой мускулатуры [16].

Молекула кальдесмона условно состоит из трех частей: С-концевая часть, которая модулирует почти все известные функциональные свойства этой молекулы, такие как связывание актина и кальмодулина, ингибирование активности актомиозин-АТФазы и сайты фосфорилирования; N-концевая часть, которая связывает миозин и слабо взаимодействует с актином и кальмодулином [24, 65].

Средняя часть, известная как «спейсер», содержит сильно заряженную повторяющуюся последовательность (рис. 4) и не обладает явными связывающими свойствами. Эта средняя часть присутствует только в гладкомышечной форме, обычно называемой высокомолекулярным кальдесмоном (Н-кальдесмон) [24, 113].

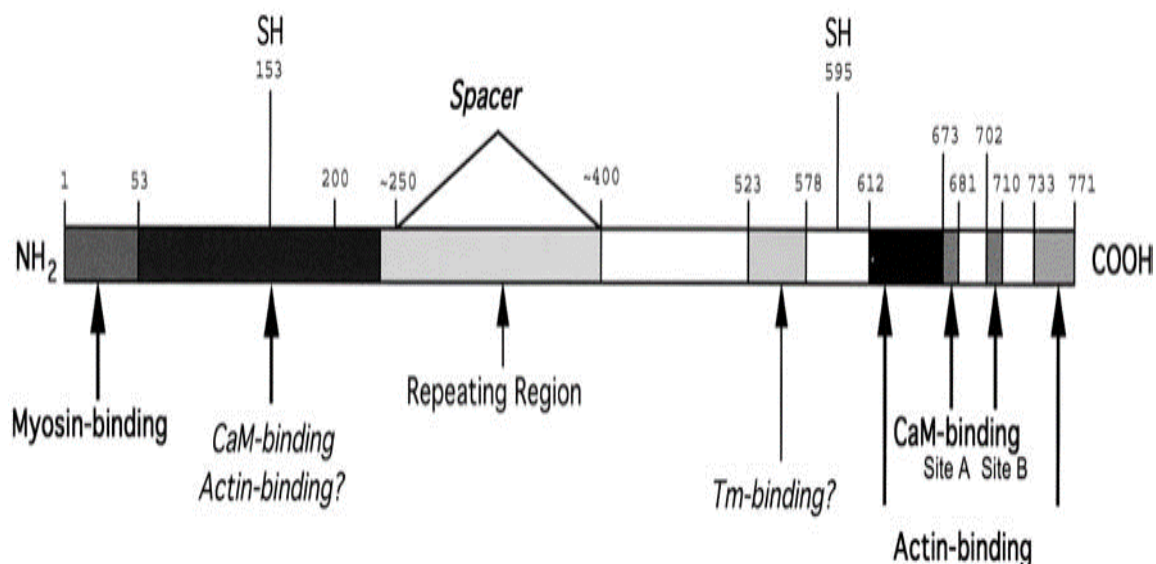


Рисунок 4. Молекулярная структура кальдесмона.

В клетках висцеральных органов более короткая версия кальдесмона экспрессируется из одного гена путем альтернативного сплайсинга с делецией средней части, в результате чего образуется

изоформа с меньшей молекулярной массой (L-кальдесмон) [119]. Две вышеперечисленные изоформы имеют фактически идентичные функциональные домены и тесно связаны с соответствующими специфическими типами клеток. Их часто используют в качестве маркеров дедифференцировки гладкомышечных клеток во время пролиферации [24].

Ген кальдесмона располагается на хромосоме 7q33 человека и имеет 17 экзонов, а его изоформы (H-кальдесмон и L-кальдесмон) в основном образуются в результате альтернативного сплайсинга экзонов 7 и 8 [108] (рис 3). Экзон 7 селективной трансляции кодирует среднюю повторяющуюся последовательность, которая специфична для H-кальдесмон (транскрипция 201,793 aa) [78].

Ген кальдесмона имеет 24 транскрипта (201–224). Транскрипт 201 может генерировать H-кальдесмон, тогда как транскрипты 202–206 и 222 могут генерировать L-кальдесмон. В зависимости от промоторов L-кальдесмон дополнительно классифицирован на Fibro-тип (WI-38) и HeLa-тип. Альтернативный сплайсинг гена кальдесмона определяет различные структуры и экспрессию изоформ [49, 107].

H-кальдесмон считается специфичным биомаркером, который не только позволяет дифференцировать клеточную лейомиому и стромальную саркому эндометрия а еще имеет диагностическое значение в других опухолях [91, 118]. Напротив, L-кальдесмон широко распространен в немышечных тканях, таких как мозг, селезенка и лимфатические узлы [64].

Изменения экспрессии двух изоформ тесно коррелируют с фенотипической модуляцией гладкомышечных клеток [110]. Экспрессия кальдесмона может переключаться с L-кальдесмона на H-кальдесмон или протекать по обратному пути - с H-кальдесмона на L-кальдесмона во время дифференцировки гладкомышечных клеток



[101]. Следовательно, разные распределения экспрессии определяют разные функции Н-кальдесмона и L-кальдесмона (рис. 5).

Н-кальдесмон и L-кальдесмон также отличаются друг от друга по локализации в клетках и в тканях. Н-кальдесмон экспрессируется в гладких мышцах сосудов и внутренних органов, а не обнаруживается в рабдомиосаркоме, миофибробластах, или новообразований, происходящих из миофибробластов [42, 91].

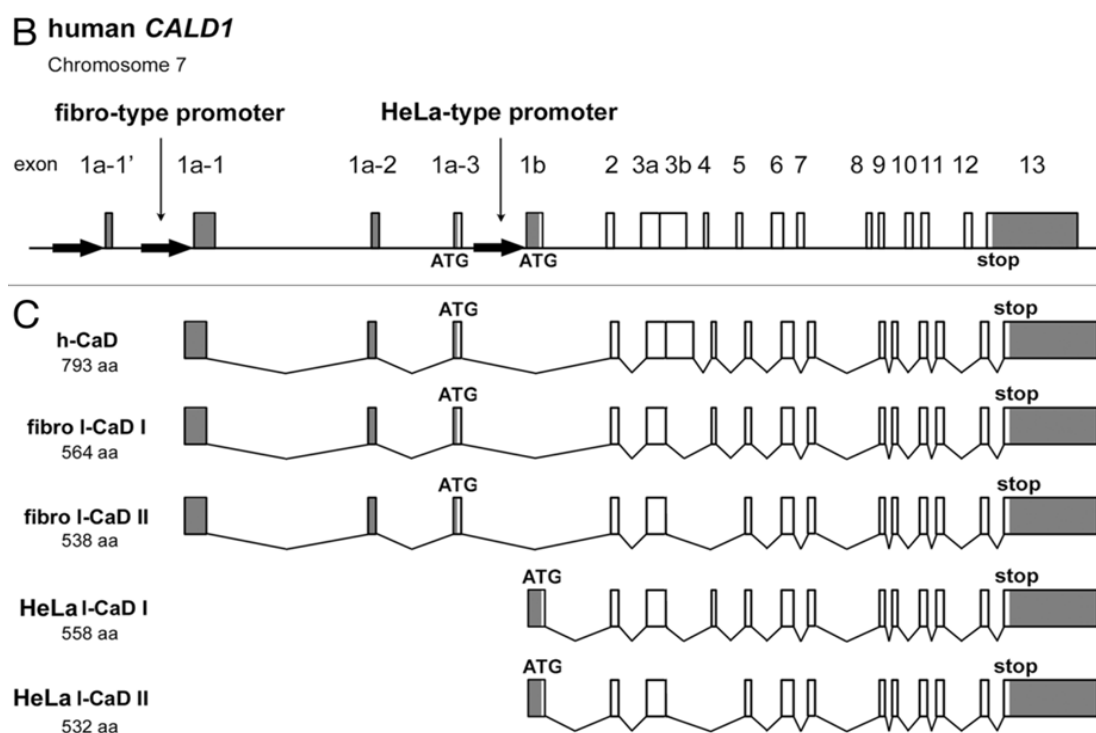


Рисунок 5. Н-кальдесмон и L-кальдесмон

Кальдесмон – многофункциональный белок, регулирующий сокращение гладких мышц и разнообразные формы немышечной подвижности, такие как секреция, адгезия, миграция и деление клеток [2]. Были охарактеризованы два класса изоформ, полученных альтернативным сплайсингом одного гена.

Гладкомышечные изоформы кальдесмона с высокой молекулярной массой (89-93 кДа) встречаются исключительно во взрослых и полностью дифференцированных клетках гладких мышц.

Немышечные изоформы кальдесмона с низкой молекулярной массой (59-63 кДа) обнаруживаются в немышечных клетках и в недифференцированных гладкомышечных клетках. Консервативные участки всех изоформ содержат свойства кальдесмона, такие как связывание с актином, тропомиозином, Ca(2+)-кальмодулином, миозином и фосфолипидами. Все изоформы также являются очень мощными ингибиторами активируемой актин-тропомиозином миозиновой MgАТРазы.

Немышечные и гладкомышечные изоформы кальдесмона выполняют различные функции *in vivo*. Это может быть отражено отчетливым клеточным распределением этих классов изоформ. Немышечный кальдесмон является регулирующим фактором в сети микрофиламентов и, таким образом, участвует в сборке и стабилизации микроволокон. Кальдесмон гладких мышц вместе с тропомиозином является опосредующим фактором для Ca(2+)-зависимого ингибирования сокращения гладких мышц [3, 24, 47].

Кальдесмон - один из немногих актин-связывающих белков, который ассоциирован с подосомами, но исключен из очаговых спаек. Кальдесмон также ингибирует функцию гельсолина и комплекса Agr2/3, которые необходимы для образования подосом [11].

Механизм обращения вспять предполагаемого ингибирования сокращения гладкой мускулатуры кальдесмоном зависит от Ca<sup>2+</sup>/кальмодулина и фосфорилирования [97]. Однако, эти процессы также зависят от концентрации Ca<sup>2+</sup> [96]. Действие становится возможным при концентрации свободного Ca<sup>2+</sup> менее 1 мкМ [96, 107]. Процесс фосфорилирования также влияет на активность кальдесмона [11].

Кальдесмон является субстратом киназы cdc2 и Erk1/2 MAPK, и фосфорилирование любой из этих киназ прекращает ингибирующие эффекты кальдесмона. Cdc2-опосредованное фосфорилирование

кальдесмона и результирующая диссоциация кальдесмона от актиновых филаментов необходимы для прогрессирования М-фазы во время митоза. Клетки, сверхэкспрессирующие актин-связывающий карбокситерминальный фрагмент кальдесмона, не могут полностью высвободить этот фрагмент из актиновых филаментов во время митоза, что приводит к более высокой частоте появления многоядерных клеток. Фосфорилирование MEK/Erk/caldesmon, опосредованное РКС, является важным сигнальным каскадом в регуляции сокращения гладких мышц. Кроме того, было показано, что активация РКС в культивируемых клетках гладкой мускулатуры сосудов приводит к ремоделированию актиновых стрессовых волокон в колонки подосом, обогащенных F-актином [37, 115].

Подосомы представляют собой адгезивные структуры цитоскелета, связанные с высвобождением металлопротеаз и деградацией внеклеточного матрикса во время клеточной инвазии. Интересно, что кальдесмон является одним из немногих актин-связывающих белков, который связан с подосомами, но исключен из очаговых спаек. Кальдесмон также ингибирует функцию гельсолина и комплекса Agr2/3, которые необходимы для образования подосом [51]. Таким образом, кальдесмон, по-видимому, имеет хорошие возможности для того, чтобы играть модулирующую роль в образовании подосом [75].

Определение роли белков, стабилизирующих актиновые нити, таких как кальдесмон и тропомиозин, в образовании подосом должно обеспечить более полное понимание молекулярных систем, которые регулируют ремоделирование актинового цитоскелета при клеточной трансформации и инвазии [57, 73, 106].

### 1.3.2. Роль кальдесмона в образовании опухолей и метастазировании

Белок кальдесмон, первоначально выделенный из гладкой мышечной ткани, где он является наиболее распространенным кальмодулинсвязывающим белком, широко распространен в актин- и миозинсодержащих клетках, где он локализован в субклеточных структурах, связанных с подвижностью, изменением формы и экзо- или эндоцитозом. Считается, что кальдесмон является актин-регуляторным белком и связывается с высоким сродством к актину или актин-тропомиозину. Кальдесмон ингибирует активацию актин-тропомиозином активности миозин-MgATPase, и ингибирование может быть обращено вспять  $Ca^{2+}$ -кальмодулин. Связывание кальдесмона с белками гладких мышц было детально изучено, что позволило построить модель, которая могла бы объяснить наблюдаемую  $Ca^{2+}$  регуляцию тонких волокон гладких мышц. Обилие кальдесмона и  $Ca^{2+}$ -регуляция его активности с помощью кальмодулина означают, что он потенциально является важным внутриклеточным регулятором таких процессов, как сокращение гладкой мускулатуры, подвижность клеток и секреция. Однако многие его свойства до сих пор не изучены.

De Marchi и соавт. исследовали корреляции между кальдесмоном и аннексином-A1 при тамоксифен-резистентном рецидивирующем раке молочной железы с положительной реакцией на эстрогеновые рецепторы (ЭР) [38]. Резистентность к терапии тамоксифеном является одной из основных причиной смерти пациентов с рецидивирующим раком молочной железы, положительным по рецептору эстрогена [22] [25].

С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения исследователи создали прогностическую сигнатуру с 4 белками для

результатов терапии тамоксифеном при рецидивирующем раке молочной железы. При этом аннексин-A1 и кальдесмон были наиболее дифференциально экспрессируемыми белками.

Сначала оценивали клиническую значимость этих маркеров в компьютерной базе данных, после чего провели иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание независимого набора опухолей, включенных в тканевой микрочип (ТМА), и регрессионный анализ в отношении времени до прогрессирования, клиническую пользу и объективный ответ. Авторы установили, что белки аннексин-A1 и кальдесмон являются независимыми маркерами результатов терапии тамоксифеном и связаны с быстрым прогрессированием опухоли [38].

На основании того, что кальдесмон ингибирует активность миозин-АТФазы и регулирует подвижность клеток, Schwappacher и соавт. исследовали влияние ЗПКІβ и кальдесмона на миграцию и инвазию клеток. Авторы показали, что ингибирование пути оксид азота (NO) - циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) - протеинкиназа G (ПКГ) (NO- цГМФ - ПКГ) уменьшало миграцию и инвазию клеток рака молочной железы человека, тогда как активация ПКГ усиливала их подвижность и инвазию [94].

Опосредованные малые интерферирующие РНК, вызывая нокдаун эндогенного кальдесмона, оказывают промиграционное и проинвазивное действие на клетки рака молочной железы человека. Восстановление клеток кальдесмона дикого типа замедляло миграцию и инвазию; однако кальдесмон, содержащий фосфомиметическую мутацию S12E, не смог восстановить промиграционную и проинвазивную активность истощения кальдесмона.

Данные работы Schwappacher и соавт. свидетельствовали о том, что по пути фосфорилирования кальдесмона протеинкиназа Іβ

(ЗПКІβ) усиливает подвижность и инвазивную способность опухолевых клеток рака молочной железы [94].

По результатам работы Kyung-Hee Kim и соавт, уровень экспрессии L-кальдесмона был значительно выше в тканях у пациентов с первичным раком толстой кишки и метастазов в печени по сравнению с уровнем в соответствующих нормальных тканях [62]. В раковых тканях, полученных от пациентов с неэффективным ответом на химиолучевую терапию, экспрессия L-кальдесмона была увеличена по сравнению с таковой в группе с хорошим ответом [62].

Kokate и соавт. показали, что кальдесмон является важным компонентом актомиозиновых пучков гладких мышц и немышечных клетках, который функционирует как динамический поперечный линкер между миозин-II и тропомиозин-актиновыми филаментами. Истощение кальдесмона приводит к aberrантному латеральному движению миозиновых филаментов II вдоль пучков актина, что приводит к неравномерному распределению миозина внутри стрессовых волокон. Это проявляется как дефекты в организации сети стрессовых волокон и сократительной способности и сопровождается проблемами клеточного морфогенеза, миграции, инвазии и механосенсорного восприятия. Эти результаты идентифицируют кальдесмон как критический фактор, который обеспечивает регулярное расположение миозина-II в пучках актомиозина немышечных клеток [65].

Кальдесмон, а также две его изоформы, считаются биомаркерами рака и мощным супрессором инвазии раковых клеток, регулируя образование подосом/инвадоподий.

Процесс инвазии – это признак прогрессирования рака, в котором частично участвуют подосомы и инвадоподии [28]. Последние представляют собой высокодинамичные структуры

клеточной адгезии, которые разрушают внеклеточный матрикс путем секреции матриксных металлопротеаз.

Следовательно, подосомы и инвадоподии позволяют клеткам проникать через базальную мембрану и мигрировать в ткани [28]. Эти адгезивные структуры называются «подосомами» в клетках, происходящих из моноцитов, остеокластами, гладкомышечными клетками и клетками, трансформированными вирусом саркомы Рауса, и «инвадоподиями» в раковых клетках.

Поскольку подосомы и инвадоподии имеют общие морфологические характеристики, функции и молекулярный состав, они считаются родственными структурами с разным клеточным контекстом.

Перечисленные данные свидетельствуют о том, что актин и связанные с ним белки важны для формирования и динамики подосом/ инвадоподий [111]. Недавно было показано, что актин-связывающий белок кальдесмон играет ключевую роль в регуляции образования и динамики подосом в гладкомышечных клетках и трансформированных вирусом саркомы Рауса фибробластах [112].

T. Yoshio и соавт. продемонстрировали, что кальдесмон негативно регулирует образование подосом в вирус-индуцированных саркомой Рауса трансформированных фибробластах, конкурируя с комплексом Arp2/3, и что фосфорилирование кальдесмона с помощью p21-активируемой киназы 1/2 дополнительно усиливает действие кальдесмона. Более того, исследователи также продемонстрировали, что кальдесмон действует как мощный репрессор инвазии раковых клеток [111].

Таким образом, авторы полагают, что снижение экспрессии кальдесмона способствует:

- образованию подосом/инвадоподии и инвазии раковых клеток;

- кальдесмон является мощным репрессором образования подосом/инвадоподии;

- сверхэкспрессия кальдесмона подавляет образование подосом, деградацию ММП и инвазию раковых клеток.

Повышенная экспрессия кальдесмона обычно наблюдается при различных видах рака. Однако значение сниженной экспрессии кальдесмона в прогрессировании рака неясно. Пониженная экспрессия кальдесмона обнаруживается в кровеносных сосудах злокачественных меланом по сравнению как с доброкачественными меланоцитарными опухолями, так и с нормальными тканями [107].

### **1.3.3. Кальдесмон и сосудистая инвазия опухолей**

Наличие инвазии сосудов считается показателем неблагоприятного прогноза при многих злокачественных опухолях [41]. Гладкие мышцы сосудов содержат как Н-кальдесмон (>75%), так и L-кальдесмон (<25%) [45]. Н-кальдесмон является наиболее специфичным и чувствительным маркером для верификации эндотелиоцитов [45, 82].

Структурная целостность и функциональная зрелость кровеносных сосудов определяются наличием нормально функционирующих эндотелиальных клеток, а также участием межэндотелиальных соединений и пристеночных клеток (гладкомышечных клеток или перицитов) [119]. Нокдаун кальдесмона вызывал серьезные дефекты васкулогенеза и ангиогенеза у морфантов рыбок Данио, при этом одновременно нарушались целостность сосудов и кровообращение [119].

Уровень экспрессии Н-кальдесмона в кровеносных сосудах меланомы проявлял отрицательную корреляцию с частотой метастазирования [63]. Эндотелиальные клетки кровеносных сосудов



в очагах меланомы оказались хрупкими по сравнению с нормальными тканями при электронной микроскопии [63]. Следует отметить, что хрупкость кровеносных сосудов может усиливать метастазирование.

В исследовании Nou Q и соавт. [54] идентифицировали биомаркеры метастазирования рака желудка с использованием количественного протеомного подхода. Белки, выделенные из панели из 4-х клеточных линий рака желудка, 2 из которых получены из первичного рака (AGS, FU97) и 2 из метастазов в лимфатические узлы (AZ521, MKN7), были помечены реагентами iTRAQ (8-plex) и проанализированы методом 2D-анализа LC-MALDI-TOF/TOF MS.

Всего с достоверностью не менее 95% был идентифицирован 641 белок. Используя пороговые значения  $>1,5$  и  $<0,67$ , было обнаружено, что 19 белков активируются, а 34 подавляются в клеточных линиях метастатического и первичного рака желудка соответственно. Некоторые из этих белков с нарушенной регуляцией, включая кальдесмон, были идентифицированы с помощью вестерн-блоттинга.

Было обнаружено, что экспрессия кальдесмона была снижена в 2 клеточных линиях, полученных из метастазов, и это было подтверждено дальнейшим анализом 7 клеточных линий рака желудка. Кроме того, иммуногистохимическое окрашивание 9 пар первичного рака желудка и соответствующей ткани метастазов в лимфатических узлах также подтвердило это наблюдение.

Наконец, нокдаун кальдесмона с помощью siRNA в клетках рака желудка AGS и FU97 приводил к увеличению миграции и инвазии клеток, в то время как сверхэкспрессия кальдесмона в клетках AZ521 приводила к снижению миграции и инвазии клеток.

Таким образом, это исследование установило потенциальную роль кальдесмона в метастазировании рака желудка. В настоящее

время проводятся дальнейшие функциональные исследования, чтобы определить основной механизм действия этого белка [54]. Таким образом, кальдесмон может рассматриваться в качестве многообещающей терапевтической онкомишени.

#### **1.3.4. Кальдесмон как возможный опухолевый биомаркер**

В последнее время кальдесмон привлекает внимание онкологов как потенциальный онкобиомаркер. Описано, что при диагностике миомы кальдесмон имеет высокое значение [88, 107], так как Н-кальдесмон является высокочувствительным и специфичным маркером дифференцировки гладких мышц и мезенхимальной природы клеток при саркоме матки [32, 79, 107].

Экспрессия Н-кальдесмона может оказаться полезной для дифференцировки стромальных опухолей эндометрия от гладкомышечных новообразований. Однако, следует учитывать, что в ряде случаев Н-кальдесмон экспрессируется в некоторых немиогенных опухолях, таких как стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественная мезотелиома плевры и гранулезоклеточные опухоли яичников у взрослых [113].

Можно сделать вывод, что наличие Н-кальдесмона не является доказанным маркером, и для уточнения диагноза диагностику следует дополнять другими маркерами [114]. Кроме того, L-кальдесмон также считается потенциальным сывороточным маркером глиомы [119].

Несмотря на разноречивость результатов, различные изоформы кальдесмона могут быть многообещающими биомаркерами для диагностики и прогноза различных мезенхимальных опухолей [107].

### 1.3.5. Кальдесмон и опухоли легкого

Обнаружение молекулярных биомаркеров для ранней диагностики и лечения рака легких по-прежнему остается сложной задачей.

Используя антитела к Н-кальдесмону, Comin, С. Е. и соавт. исследовали 70 случаев эпителиальных мезотелиом и 70 случаев аденокарцином легких. Кроме того, во всех случаях мезотелиомы была проведена иммуногистохимия на мышечные маркеры, такие как десмин, альфа-гладкомышечный актин, мышечно-специфический актин, миоглобин, миогенин, миозин и MyoD-1. Реактивность к Н-кальдесмону была получена в 68 (97%) из 70 эпителиальных мезотелиом, но ни в одном из случаев аденокарциномы.

Все случаи мезотелиомы оказались отрицательными для других исследованных мышечных маркеров. Авторы пришли к заключению, что Н-кальдесмон является высокочувствительным и специфичным маркером и предложили его включение в иммуногистохимическую панель для дифференциальной диагностики эпителиоидной мезотелиомы и аденокарциномы легкого [34].

В своей работе Zhang и соавт. пытались выяснить взаимосвязи между экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), кальдесмона, белка ремоделирования матрикса - остеопонтина (OPN) и клиническими параметрами, особенно метастазированием рака легкого. Они обнаружили, что экспрессия iNOS, кальдесмона и OPN тесно связана с метастазированием рака легкого.

Образцы внутричерепных метастатических тканей рака легкого показали значительно более высокую экспрессию iNOS, кальдесмона и OPN. Анализ методом проточной цитометрии периферической крови больных раком легкого показал увеличение числа клеток EPCAM+/OPN+ в кровотоке пациентов с метастазами в кости по

сравнению с пациентами без метастазов, что свидетельствовало о циркулирующих раковых клетках.

Концентрация OPN в сыворотке также была положительно связана с метастазированием рака легкого в кости. Эти результаты позволили предположить, что iNOS, OPN, и кальдесмон могут рассматриваться как биомаркеры метастазирования рака легких [16] [116].

#### **1.4. Матриксные металлопротеиназы**

Семейство матриксных металлопротеиназ человека (ММП) включает в себя несколько жестко регулируемых классов протеаз. Эти ферменты и их специфические ингибиторы играют важную роль в прогрессировании опухоли и метастатическом процессе, способствуя деградации внеклеточного матрикса. По мере углубления научного понимания ММП быстро развивались терапевтические стратегии, направленные на блокирование этих ферментов ингибиторами ММП (ММПИ) [76].

##### **1.4.1. Структура и функции матриксных металлопротеиназ**

Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой семейство цинк-зависимых эндопептидаз, которые участвуют в деградации различных белков во внеклеточном матриксе. Как правило, ММП имеют пропептидную последовательность, каталитический металлопротеиназный домен с каталитическим цинком, шарнирную область или линкерный пептид и гемопексиновый домен [9, 10].

ММП обычно классифицируются на основе их субстратов и организации их структурных доменов на коллагеназы, желатиназы,

стромелизины, матрилизины, ММП мембранного типа и другие ММП [6, 23, 66, 89].

Функции ММП разнообразны в отношении как эндотелия, коллагена, так и мышечно-сосудистой системы [4, 6, 21]. Отмечается их участие при морфо- и ангиогенезе, так и при процессе регенерации, а также при фиброзных нарушениях, остеоартрите и раке. Увеличение специфических ММП может играть определенную роль в ремоделировании артерий, образовании аневризм, расширении вен и нарушениях венозной функции нижних конечностей. ММП также играют важную роль в инфильтрации лейкоцитов и воспалении тканей [122].

ММП были обнаружены при онкологических процессах, и повышенные уровни ММП были связаны с прогрессированием опухоли и ее инвазивностью [9, 86].

ММП были предложены в качестве биомаркеров для многочисленных патологических состояний и изучаются в качестве потенциальных терапевтических мишеней при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата, а также при онкологическом процессе [23, 58].

По сравнению с ММП беспозвоночных, ММП позвоночных имеют разнообразные подтипы и сложные функции.

Ремоделирование внеклеточного матрикса имеет решающее значение для многих физиологических (миграция клеток, пролиферация, рост и развитие) и патологических (ремоделирование сердца, канцерогенез, метастазирование и т.д.) событий. Таким образом, взаимодействие между клетками и внеклеточным матриксом играет ключевую роль в нормальном развитии и дифференцировке организма, а также в механизмах многих патологических состояниях [10,12].

Изменения во внеклеточном матриксе регулируются системой протеолитических ферментов, которые отвечают за протеолиз огромного количества компонентов внеклеточного матрикса. ММП представляют собой основную группу регулирующих протеаз во внеклеточном матриксе. Способность матриксных металлопротеиназ изменять структурную целостность тканей необходима для определенных аспектов нормальной физиологии и патологии [44, 102]. Способность перерабатывать такие молекулы, как факторы роста, рецепторы, молекулы адгезии, другие протеиназы и ингибиторы протеиназ, делает ММП мощными регуляторами физиологических и патологических процессов в клеточном микроокружении. Гиперактивация ММП связана с многочисленными патологическими состояниями [21, 81, 85].

Особого внимания заслуживают МТ4-ММП [83], так как усиление синтеза МТ4-ММП отмечается при различных видах опухолевого процесса, однако, в контексте нашего исследования, наиболее интересен факт повышения этого маркера при метастазировании рака молочной железы в легкие. Предполагается, что МТ4-ММП стимулируют прогрессирование опухолевого процесса и метастазирования [109].

#### **1.4.2. МТ4-ММП при опухолях различных органов**

МТ4-ММП принадлежит к матриксным металлопротеиназам мембранного типа (МТ-ММПIS), отдельному подмножеству семейства ММП, которое прикреплено к поверхности клетки, в данном случае с помощью гликозилфосфатидилинозитольного окончания. МТ4-ММП содержит последовательность фурина (R-X-K/R-R) и может быть активирована фурином. Форма-предшественник (69 кДа) обнаруживается в комплексе Гольджи, в то время как обработанная

форма (58 кДа) присутствует на мембране. Биосинтез МТ4-ММП протекает по уникальному пути, который завершается в комплексе Гольджи [29, 52].

Экспрессия МТ4-ММП при различных видах рака хорошо изучена. Однако, молекулярные механизмы, с помощью которых МТ4-ММП способствует развитию опухоли, нуждаются в дальнейшем изучении. Исследователи стремятся обобщить вклад МТ4-ММП в онкогенез, сосредоточив внимание на молекулярных механизмах, запускаемых ферментом при миграции опухолевых клеток, инвазивности и пролиферации, в сосудистой сети опухоли и микроокружении, а также во время метастазирования [77].

Так, в частности, выделяют предполагаемые обработанные субстраты и сигнальные каскады, активируемые МТ4-ММП, которые могут лежать в основе этих злокачественных процессов, и сравнивают это с тем, что известно о его роли во время эмбрионального развития.

Наконец, МТ4-ММП является важным биомаркером злокачественности опухоли, который может быть использован для мониторинга прогрессирования рака у пациентов, а также служить потенциальной мишенью для будущей разработки терапевтических препаратов. [105].

Было описано, что МТ4-ММП обладает агрегканазной активностью, что указывает на его роль в гомеостазе хряща. При различных видах остеоартрита была обнаружена повышенная регуляция как мРНК МТ4-ММП, так и самого белка МТ4-ММП. Транскрипты МТ4-ММП обнаружены в хряще человека при остеоартрите, но не в интактном контрольном хряще без патологии. Повышение синтеза провоспалительных молекул значительно увеличивает экспрессию МТ4-ММП в дисках суставного хряща, полученных из бедренно-надколенной бороздки телят (экспериментальные данные). МТ4-ММП способен расщеплять

изоформу ADAMTS4 p68, которая обладает относительно низкой активностью аггреканазы, с образованием изоформы ADAMTS4 p53, которая является высокоактивной формой. При воспалительных состояниях количество общего белка ADAMTS4 не модулируется. Однако изоформа ADAMTS4 p53 встречается в большем количестве, чем изоформа p68, что отражает повышение активности аггреканазы. Образование изоформы p53 напрямую связано с экспрессией MT4-ММП. Все эти данные указывают на роль MT4-ММП в регуляции хрящевой перестройки при остеоартите в условиях воспаления и открывают новые терапевтические перспективы в лечении остеоартрита и онкообразований хрящевой ткани [43].

MT4-ММП экспрессируется в липидных рафтах высокометастатической клеточной линии рака толстой кишки HM-7, что позволяет предположить роль MT4-MMP в метастатическом распространении рака толстой кишки [83].

Роль MT4-ММП в регуляции стабильности сосудов при онкологии и сосудистых заболеваниях хорошо известна. Недавно о его роли в развитии аневризм и расслоений грудной аорты сообщалось в исследовании скрининга 58 пациентов с наследственной предрасположенностью к аневризме аорты. Была выявлена мутация R373H в гене *mt4-mmp*, которая предотвращает экспрессию протеазы. Снижение MT4-ММП ассоциировано с развитием гипотензии, расслоением аорты и образованием фиброза, а также онкообразованием сердечно-сосудистой системы. Кроме того, экспрессия MT4-MMP обнаруживается у периаортальных предшественников во время эмбриогенеза, что позволяет предположить роль MT4-ММП в раннем построении стенки аорты и созревании сердечно-сосудистой системы. В другой модели повреждения сосудов, вызванного перевязкой сонной артерии, у мышей с MT4-ММП-нулевым уровнем наблюдается изменение



ремоделирования сосудов, характеризующееся более выраженной неоинтимой в сонных артериях и повышенной пролиферацией сосудистой стенки. Атеросклероз может быть связан с расслоением аорты. Интересно, что отсутствие экспрессии МТ4-ММП коррелирует с отложением липидов в атеросклеротических бляшках [29, 83]. Также отмечается прямая корреляция между наличием онкологического процесса в сердечно-сосудистой системе и уровнем МТ4-ММП, что свидетельствует о перспективном изучении этой молекулы в качестве маркера онкодиагностики и возможной мишени для оптимизации противоопухолевой терапии [9].

#### **1.4.3. МТ4-ММП в процессе образования опухолей легкого**

Специфическая роль ММП и их ингибиторов в прогрессировании рака широко признана. Хотя семейство ММП человека состоит из 25 ферментов, интенсивно изучались только пять ММП, включая четыре растворимые формы (ММП-1, -2, -9 и -13) и мембранную форму (МТ1-ММП). Такой интерес к этим ММП связан с их сверхэкспрессией, выявленной на основе геномных и транскриптомных данных, собранных по различным типам рака человека [109].

МТ4-ММП обладает уникальными функциями и различными субстратами, способствующими различным патологиям, особенно при прогрессировании опухоли. Все эти данные подтверждают разработку блокирующих молекул для противодействия эффектам МТ4-ММП. Патологические функции этой протеазы зависят главным образом от ее протеолитической активности. Интересно, что каталитический домен МТ4-ММП обладает последовательностью, отличной от последовательности других ММП, что позволяет разрабатывать

специфические ингибиторы в качестве антител, блокирующих функцию МТ4-ММП [33].

Было доказано, что экспрессия МТ4-ММП индуцирует развитие метастазов в легких путем дестабилизации кровеносной сети, характеризующейся увеличением просветов кровеносных сосудов и отслойкой перицитов. Хотя различий в продукции ключевых ангиогенных модуляторов (VEGF, PDGFR, FGF и их рецепторов) обнаружено не было, экспрессия человеческого тромбоспондина-2 (TSP-2) снижена в ксенотрансплантатах МТ4-ММП. Этот результат согласуется со снижением этого антиангиогенного фактора, которое было связано с нарушением целостности и проницаемости сосудов [30].

Другие данные показывают, что в клетках рака молочной железы МТ4-ММП способствует росту первичной опухоли и метастазированию в легкие. Хотя транспортировка и интернализация трансмембранного мембранного ММП типа 1 были тщательно исследованы, мало что известно о регуляторных механизмах МТ4-ММП. МТ4-ММП образует гомофильные комплексы на поверхности клетки и интернализуется в ранних эндосомах, при этом часть фермента либо саморазлагается, либо рециркулируется на поверхность клетки.

Эти данные указывают на то, что МТ4-ММП интернализуется путем клатрино-независимых переносчиков ранних эндосомальных комплексов, механизмом, который отличается от того, который отвечает за интернализацию других членов ММП мембранного типа. Хотя МТ4-ММП локализуется с помощью кавеолина-1, на интернализацию МТ4-ММП не влияли ингибиторы путей эндоцитоза кавеолина-1 или клатрина, но она была снижена путем сайленсинга CDC42 или RhoA с помощью небольшой интерферирующей РНК. Это дает представление о новом механистическом представлении о

регуляторных механизмах МТ4-ММП, которое может иметь значение для разработки новых терапевтических стратегий при метастатическом раке молочной железы. [70, 98].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует об актуальности и своевременности изучения кисспептинов и ассоциированных с ними сигнальных молекул в качестве модуляторов опухолевого роста в целом (и, в частности, образования и развития рака легких).

В этом контексте их также следует рассматривать в качестве потенциально возможных биомаркеров для оптимизации молекулярной диагностики различных типов рака легких и персонализированной оценки прогноза их развития.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Характеристика исследуемого материала**

Материалом для исследования послужили 34 образца опухолей легких (только аденокарциномы). Из них 15 (44,1 %) принадлежали мужчинам, а 19 (53,9 %) – женщинам. Средний возраст мужчин в исследовании составил  $65,1 \pm 4,6$ , а женщин  $68,3 \pm 5,8$  лет соответственно. Различия по полу и возрасту в сформированных группах не выходили за границы статистической погрешности ( $p < 0,05$ ).

Образцы опухолей легких были получены в патологоанатомическом отделении, а молекулярно-морфологическое исследование образцов было проведено в отделе трансляционной биомедицины научно-педагогической базы СПбГУ - ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ.

При сравнительном анализе уровней экспрессии изучаемых сигнальных молекул в образцах опухолей учитывались размер опухолей (по номенклатуре TNM), степень их дифференцировки (по системе Grading) и характер вторичных изменений в новообразованиях.

#### **2.1.1. T – размеры опухоли по классификации TNM**

Классификация TNM утверждена Международным Агентством по изучению рака (Лион, Франция). Она определяет характеристику опухолей по ее размерам, региональным и отдаленным метастазам.

T – tumor (опухоль). Буквенное обозначение T лежит в основе классификации и означает, что опухоль первична. При росте от

начальной стадии к последующим этапам к этому обозначению добавляются уточняющие характеристики:

- **Tx** – недостаточно данных, позволяющих описать опухоль, или же она отсутствует.
- **T0** – так называемая «нулевая» стадия, или предрак.
- **Tis** – стадии рака *in situ*, буквально «на месте». Это неинвазивный тип рака, опухоль локализуется только в пределах эпителиальной ткани, не прорастая в орган.
- **T1** – в эту группу входят опухоли размером от 0,1 мм до 2 см, они также неинвазивны. Группа **T1** включает несколько подкатегорий: это **T1a** (0,1 – 0,5 см), **T1b** (0,5 – 1 см) и **T1c** (1-2 см).
- **T2** – это одна из стадий рака, когда злокачественные клетки уже имеют тенденцию к инвазивности и опухоль распространяется на ткани пораженного органа, но не выходя за его пределы. Лимфатические узлы могут быть поражены, но в определенной, умеренной степени и только близлежащие. Размеры опухоли не превышают 2-5 см, такие новообразования полностью операбельны.
- **T3** – относится к потенциально опасным стадиям, в этом случае опухоль вырастает до 5-7 см и более, а распространяется за пределы органа, на лимфоузлы. Этой стадии уже свойственны метастазы, включая обнаружение очагов в отдаленных органах.
- **T4** – относят к терминальным стадиям рака, когда борьба с болезнью чаще всего действительно малоэффективна, а смысл любой терапии сводится к облегчению состояния больного. Размер самой опухоли, степен её инвазии, прорастания в ткани, сосуды и органы уже имеет вторичное значение, поскольку злокачественные клетки присутствуют в лимфе.

### 2.1.2. Система Grading определения уровня дифференцировки опухоли

Система Grading утверждена Международным Агентством по изучению рака (Лион, Франция). С помощью световой микроскопии по этой системе устанавливается степень злокачественности как по форме раковых клеток, так и в целом по самой видоизмененной ткани. Чем выше значение показателя, тем агрессивнее и активнее ведет себя опухоль.

В данной системе оценка варьирует от 1 до 4 степени.

В том случае, когда видоизмененная ткань и клеточные конгломераты выглядят близкими к нормальным, то опухолевая ткань называется «хорошо дифференцированной» и относится к 1 степени. Данная степень имеет хороший прогноз и невысокую степень скорости прогрессирования онкологического процесса.

«Мало/плохо дифференцированные» (Grade 2 и/или Grade 3) или «недифференцированные» (Grade 3 или 4) опухолевые клетки и ткани имеют наихудшие прогноз и быструю степень метастазирования, высокую агрессивность процесса.

Следовательно, система Grading обозначает «злокачественность» онкологического процесса:

- GX — не определена (мало данных);
- G1 — высокодифференцированная (неагрессивная);
- G2 — умеренно дифференцированная (умеренно-агрессивная);
- G3 — низкодифференцированная (высокоагрессивная);
- G4 — недифференцированная опухоль (высокоагрессивная).

## 2.2. Методы исследования

Из образцов опухолей (парафиновые блоки) готовили срезы (5 мкм). Срезы обрабатывались стандартно, проводилась ИГХ реакция. Применяли первичные моноклональные АТ к протеину Ki-67 (интегральному маркеру пролиферации клеток), кисспептину-1, кальдесмону и матриксной металлопротеиназе типа 4 (все Abcam, 1:100).

Для верификации иммуногистохимической окраски использовали универсальный набор, содержащий биотинилированные Ig (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB). Для выявления пероксидазы хрена применяли диаминобензидин.

Протокол иммуногистохимического исследования приводится ниже.

### 2.2.1. Иммуногистохимический метод исследования

- Приготовить три емкости по 200 мл: дистиллированной воды, перекиси водорода (20 мл маточного раствора + 180мл дистиллированной воды) и буфера для промывки образцов (WB).
- Быстро перенести срезы в WB и оставить при комнатной температуре на 10 мин.
- Промыть в дистиллированной воде.
- Поместить в перекись  $H_2O_2$  (15%) на 10 мин.
- Перенести в WB на 10 мин.
- Удалить избыток влаги со стекол.
- Перед нанесением первичных антител обвести срезы гидрофобным маркером.

- Нанести первичные антитела в необходимой концентрации на срезы (20–40 мкл на стекло в зависимости от количества срезов) и инкубировать во влажной камере 12 часов при температуре 3°C.
- Промыть в дистиллированной воде.
- Погрузить штатив со срезами в свежий WB на 10 мин.
- Удалить избыток влаги со стекол.
- Нанести вторичные антитела на срезы (20 – 40 мкл).
- Инкубировать 30 мин при комнатной температуре во влажной камере.
- Промыть в дистиллированной воде и повторить п.10.
- Удалить избыток влаги со стекол.
- Развести хромоген из расчета 1:50, нанести на препараты.
- Инкубировать около 1 мин (прохождение реакции контролировать под микроскопом).
- Поместить штатив со стеклами в контейнер с дистиллированной водой.
- Погрузить препараты в контейнер с гематоксилином на 1-2 мин.
- Проявлять окрашивание гематоксилином в течение 10 мин в проточной воде. Данный краситель окрашивает базофильные клеточные структуры, которые содержат нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), синим цветом: клеточное ядро, рибосомы и РНК-богатые участки цитоплазмы.
- Погрузить препараты в контейнер со свежей дистиллированной водой на 3 мин.
- Просушить срезы в термостате при температуре 60°C.
- Продержать 30 мин в ксилоле для просветления.
- Перед заключением промокнуть срезы чистой фильтрованной бумагой (во избежание появления пузырей на готовом препарате).
- Заключить в монтирующую среду (UltraKitt, J.T. Baker).



### 2.2.2. Морфометрия микроскопических изображений

Для количественного морфометрического исследования результатов иммуногистохимических реакций использовался программно-аппаратный комплекс на базе инвертированного микроскопа Olympus IX73 с цифровой камерой Olympus DP80 и программным обеспечением для архивирования и анализа изображений Olympus CellSens (Olympus).

Камера Olympus DP80 является двухсенсорной (монохромной и цветной одновременно), и благодаря двум CCD-датчикам, позволяет получать как цветные, так и монохромные изображения, обеспечивая высокое разрешение изображения в светлом поле с ферментными системами визуализации клеточных рецепторов и чувствительное обнаружение молекул биомаркеров с флуоресцентными красителями.

Размер квадратного пикселя 6,45 мкм и активное охлаждение обеспечивают высокую чувствительность и высокое соотношение сигнал/шум, необходимые для регистрации объема и локализации молекулярных маркеров. Возможность совмещения цветных и монохромных изображений позволяет создавать наложенные изображения, чтобы подтвердить положение молекул в соотношении с морфологической структурой.

Программное обеспечение Olympus CellSens Standard позволяет захватывать изображения, производить настройку и работу с изображениями в реальном времени, архивировать файлы в галерею в формате JPEG, TIFF и PNG, работать с многослойными изображениями, проводить анализ изображений по цвету или образцу, производить интерактивные измерения углов, расстояний, площадей, запись этих данных на изображение с возможностью сохранения исходного.

Программное обеспечение CellSens Standard также выводит данные за пределы одного изображения, используя расширенные процессы захвата изображений (например, интервальную съемку) и управление моторизованными и кодированными компонентами микроскопа.

Проводили измерение относительной площади экспрессии сигнальных молекул (определяемой методом иммуногистохимии) к общей площади клеток в поле зрения. Относительную площадь экспрессии выражали в процентах.

### **2.2.3. Методы статистической обработки**

Полученные результаты проверяли на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае если данные соответствовали нормальному закону распределения - типичное значение представляли в виде  $M \pm \sigma$ , сравнение групп осуществляли с помощью критерия Стьюдента. При несоответствии данных нормальному закону распределения типичное значение представляли в виде медианы и межквартильного интервала, сравнение групп осуществляли с помощью критерия Манн-Уитни.

Дополнительно применяли критерий хи-квадрат.

Также было проведено угловое преобразование Фишера. Нулевая гипотеза и ДИ оценивались стандартно.

При решении задачи прогнозирования метастазирования аденокарциномы использовали дискриминантный анализ, метод последовательного анализа А. Вальда в модификации Е.В. Гублера и нейросетевую модель. Применялся метод глобальной оптимизации, случайного поиска, создание алгоритмов.

При создании нейронной сети использовали комбинированный метод глобальной оптимизации, которая заключалась в применении на различных итерациях методов сопряженных градиентов, случайного поиска, инерционного и генетического алгоритмов.

В основе методики последовательного анализа А. Вальда в модификации Е.В. Гублера, положена формула Т. Байеса для независимых признаков, метод последовательного анализа А. Вальда и статистика С. Кульбака.

Суть статистического метода заключается в том, чтобы определить по величине конкретного признака информацию о наличии или отсутствии метастазирования. Так если точку А принять за наличие метастазов, а точку В за отсутствие, то если в точке А признак максимален, а в точке В незначителен, то он является маркером метастазирования. При равном соотношении признаков в точке А и В, или почти равном, признак нельзя считать маркером диагностики.

Этим методом также можно определить вероятность заболевания по совокупности признаков:

$$DK_i = 5 * \lg \frac{P_j(A)}{P_j(B)} \quad (2.1)$$

где  $DK_i$  – диагностический коэффициент, рассчитываемый для каждой из градаций вопроса,  $P_j(A)$  – вероятность попадания респондента в группу А при градации ответа  $S_j$ .  $P_j(B)$  – вероятность респондента попадания в группу В при градации ответа  $S_j$ .

Данный метод опирается на различиях во встречаемости признаков в двух подгруппах, и при схожих значениях в группах А и

В, информативность признака при разделении совокупности снижается.

Для оценки информативности признака использовали критерий С. Кульбака. Информативность градаций признака рассчитывали, т.н. прогностического коэффициента согласно:

$$r(X_{ij}) = 0,5[P2 - P1] \cdot 51g(P2/P1), \quad (2.2)$$

где P2 - вероятность состояния «отсутствие метастазирования»  
P1 - вероятность состояния «возникновение случая заболевания с ВУТ». И далее, вычисляли информативность всего признака:

$$R(x_i) = \sum_{k=1}^n r(X_{ij}) \quad (2.3)$$

Принятие решения отнесения обследованных по группам («без риска метастазирования» или «повышенного риска метастазирования») производилось следующим образом: заполняли карту на каждого обследованного, суммировали диагностические коэффициенты по каждому конкретному респонденту и определяли суммарные диагностические коэффициенты (СДК).

Далее проведен сравнительный анализ с положенным значением, которое было выбрано как 0. Все, что меньше 0, свидетельствовало об отсутствии риска метастазирования. Все, что больше 0, свидетельствовало о высоком риске метастазирования.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Анализ общебиологических и гендерных параметров опухолей

Анализ результатов морфологического исследования показал, что метастазы наблюдались в 5 (14,7 %) случаях. Наличие метастазирования в зависимости от пола представлено в табл. 1.

Таблица 1. Наличие метастазирования в зависимости от пола пациента.

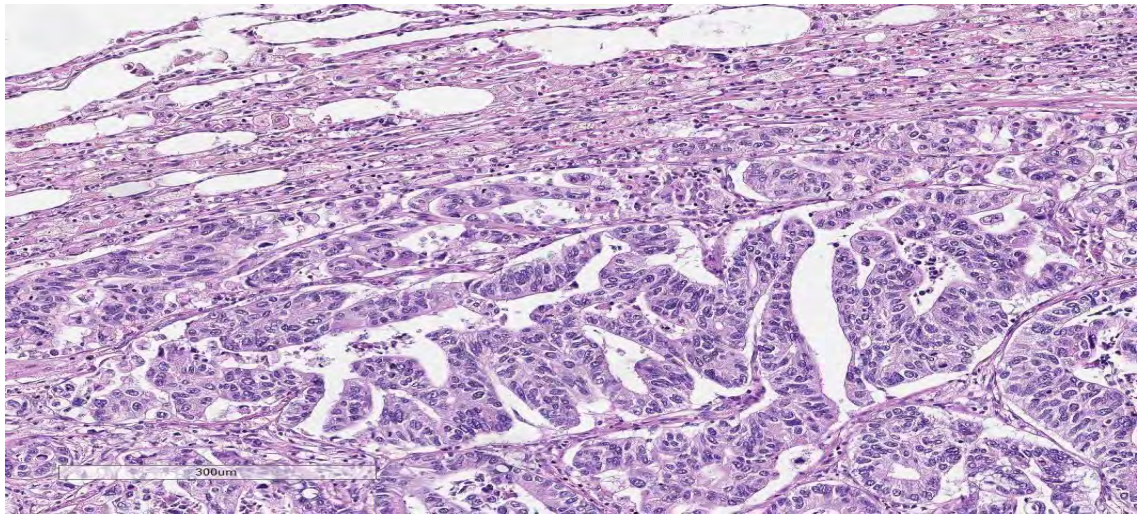
Наличие метастазирования	Пол			
	Мужской		Женский	
	Абс	%	Абс	%
Да	3	20,0	2	10,5
Нет	12	80,0	17	89,5
Примечание: *различия в показателях при $p < 0,05$				

Как видно из табл., в исследовании не обнаружено статистически значимых различий в частоте метастазирования у мужчин и женщин.

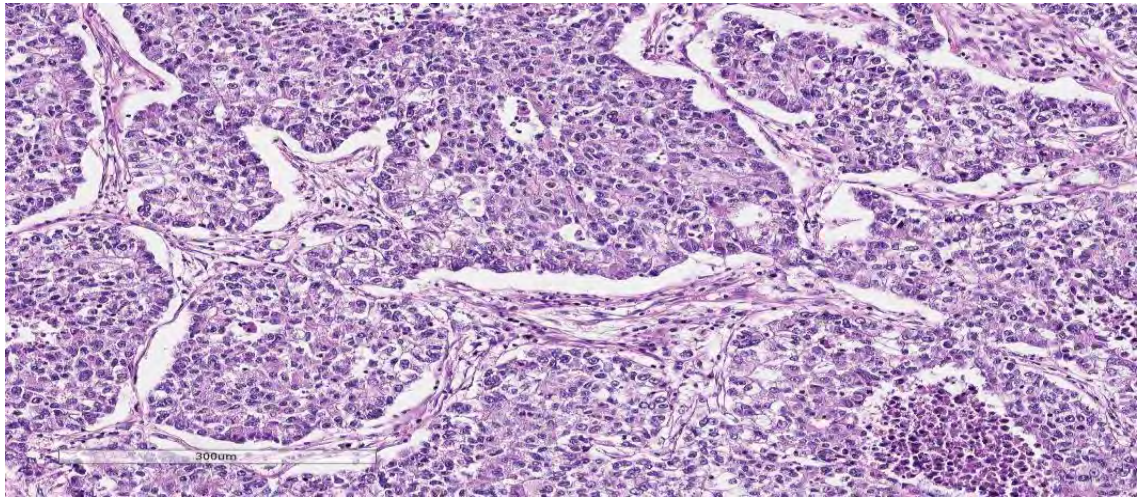
Наиболее часто – 19 (55,9 %) встречались опухоли умеренной степени дифференцировки, на втором месте была низкая - 12(35,3 %) и на третьем - высокая (8,8 %).

Распределение выявленных опухолей по Grade в зависимости от пола представлена в табл. 2, а их гистологическая картина на рис. 6.

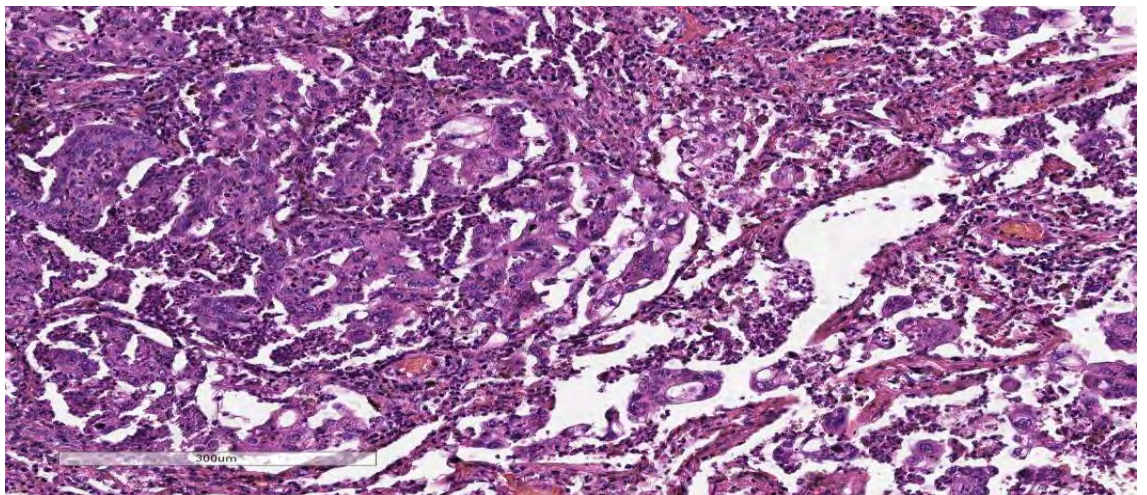




А



Б



В

Рисунок 6. Карцинома легкого различной степени дифференцировки. А – G1; Б – G2; В – G3.

## Окраска гематоксилином-эозином. Х200.

Как видно из табл. 2, в исследовании не обнаружено статистически значимых различий в степени дифференцировки у мужчин и женщин. Анализ размера опухолей показал монотонное убывание частот – 18 (52,9 %) для Т1, 11 (32,4 %) для Т2, 3 (8,8 %) для Т3 и 2 (5,9 %) для Т4.

Таблица 2. Степень дифференцировки опухолей в зависимости от пола.

Степень дифференцировки	Пол			
	Мужской		Женский	
	Абс	%	Абс	%
Низкая	4	26,7	8	42,1
Умеренная	10	66,7	9	47,4
Высокая	1	6,7	2	10,5
Примечание: *различия в показателях при $p < 0,05$				

Распределение размера опухолей в зависимости от пола представлено в табл. 3.

Таблица 3. Размер опухолей в зависимости от пола пациента.

Размер опухоли	Пол			
	Мужской		Женский	
	Абс	%	Абс	%
Т1	9	60,0	9	47,4
Т2	6	40,0	5	26,3
Т3	-	-	3	15,8
Т4	-	-	2	10,5
Примечание: *различия в показателях при $p < 0,05$				



Как видно из табл. 3, в исследовании не обнаружено статистически значимых различий в размере опухоли у мужчин и женщин.

Признаки лимфо-васкулярной инвазии и некроза были выявлены в большинстве случаев (23) и составили 67,6 %. В исследовании различия этих показателей среди мужчин и женщин не выходили за рамки статистической погрешности ( $p > 0,05$ ).

Воспалительный процесс был характерен в большинстве 24 (70,4 %), а кровоизлияния в половине 20 (58,8 %) случаев.

Распределение вторичных изменений в опухоли в зависимости от пола представлено в табл. 4.

Таблица 4. Вторичные изменения опухоли в зависимости от пола.

Вторичные изменения	Пол			
	Мужской		Женский	
	Абс	%	Абс	%
Лимфо-васкулярная инвазия	10	66,7	13	68,4
Некроз	11	73,3	12	63,2
Кровоизлияния	10	66,7	10	52,6
Воспаление	12	80,0	12	63,2
Примечание: *различия в показателях при $p < 0,05$				

Как видно из табл. 4, в исследовании не обнаружено статистически значимых различий во вторичных изменениях опухолевого процесса у мужчин и женщин.



### 3.2. Анализ гендерных особенностей пролиферативной активности и иммунофенотипов опухолевых клеток

Пролиферативная активность опухолей по экспрессии Ki-67 в среднем составила  $24,0 \pm 9,0$  %. Относительные площади экспрессии киспептина, кальдесмона и матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 составляют  $13,6 \pm 2,6$  %,  $7,1 \pm 1,2$  % и  $6,6 \pm 0,9$  соответственно. Распределение иммуногистохимических показателей в зависимости от пола представлено в табл. 5.

Таблица 5. Относительная площадь экспрессии (%) сигнальных молекул в опухолях легких в зависимости от пола пациента.

Иммуногистохимические показатели	Пол	
	Мужской	Женский
Ki-67	$26,3 \pm 14,7$	$22,3 \pm 10,8$
Киспептин	$12,9 \pm 4,0$	$14,2 \pm 3,6$
Кальдесмон	$6,7 \pm 2,0$	$7,4 \pm 1,6$
Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 4	$7,1 \pm 1,5$	$6,2 \pm 1,2$
Примечание: *различия в показателях при $p < 0,05$		

Как видно из табл. 5, в исследовании не обнаружено статистически значимых различий в иммуногистохимических показателях у мужчин и женщин.

Таким образом, сформированные группы мужчин и женщин с аденокарциномами были сравнимы по всем изученным параметрам.

Наиболее часто (в 55,9 % случаев), встречались опухоли умеренной степени дифференцировки, метастазы наблюдались в 14,7 % случаях. Более половины (52,9 %) представленных опухолей классифицировались как T1.

Вторичные проявления лимфо-васкулярной инвазии и некроза были выявлены в большинстве случаев (67,6 %). Воспалительный процесс был характерен в большинстве (70,4 %), а кровоизлияния более чем в половине (58,8 %) изученных препаратов.

Пролиферативная активность опухолей по уровню экспрессии Ki-67 в среднем составила  $24,0 \pm 9,0$  %. Относительные площади экспрессии киспептина, кальдесмона и матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 составили  $13,6 \pm 2,6$  %,  $7,1 \pm 1,5$  % и  $6,6 \pm 0,9$  соответственно.

### 3.3. Анализ прогностической значимости экспрессии киспептина-1 и ассоциированных с ним молекул в опухолях легких

В процессе исследования была установлена зависимость между метастазированием и степенью дифференцировки опухоли ( $R=0,5$ ,  $p<0,05$ ). Так, наличие метастазов было характерно только для низкой степени дифференцировки опухолей.

Таблица 6. Относительная площадь экспрессии сигнальных молекул (%) и степени дифференцировки опухоли.

Иммуногистохимические показатели	Степень дифференцировки		
	Низкая	Умеренная	Высокая
Киспептин*	$0,3 \pm 0,2$	$9,9 \pm 2,8$	$22,6 \pm 2,2$
Кальдесмон*	$0,4 \pm 0,2$	$5,9 \pm 2,8$	$10,5 \pm 1,1$
Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 4*	$18,4 \pm 2,3$	$8,6 \pm 1,5$	$0,5 \pm 0,3$

Примечание: \*различия в показателях при  $p<0,05$  при переходе от низкой к умеренной и высокой степени дифференцировки опухоли

В тоже время анализ возрастной структуры показал, что вторая степень дифференцировки опухоли приходилась на более старшие возраста ( $70,7 \pm 3,8$  лет) чем первая ( $60,5 \pm 6,2$  лет) или третья ( $68,3 \pm 11,8$ ) ( $R=0,4$ ,  $p<0,05$ ). Указанная особенность была характерна как для мужчин, так и для женщин.

Анализ изменения относительной площади экспрессии киспептина и кальдесмона в зависимости от дифференцировки опухоли позволяет говорить о наличии высокой степени взаимосвязи ( $R=-0,8$ ,  $p<0,05$ ). Оценка иммуногистохимических маркеров и степени дифференцировки опухоли представлена в табл. 6.

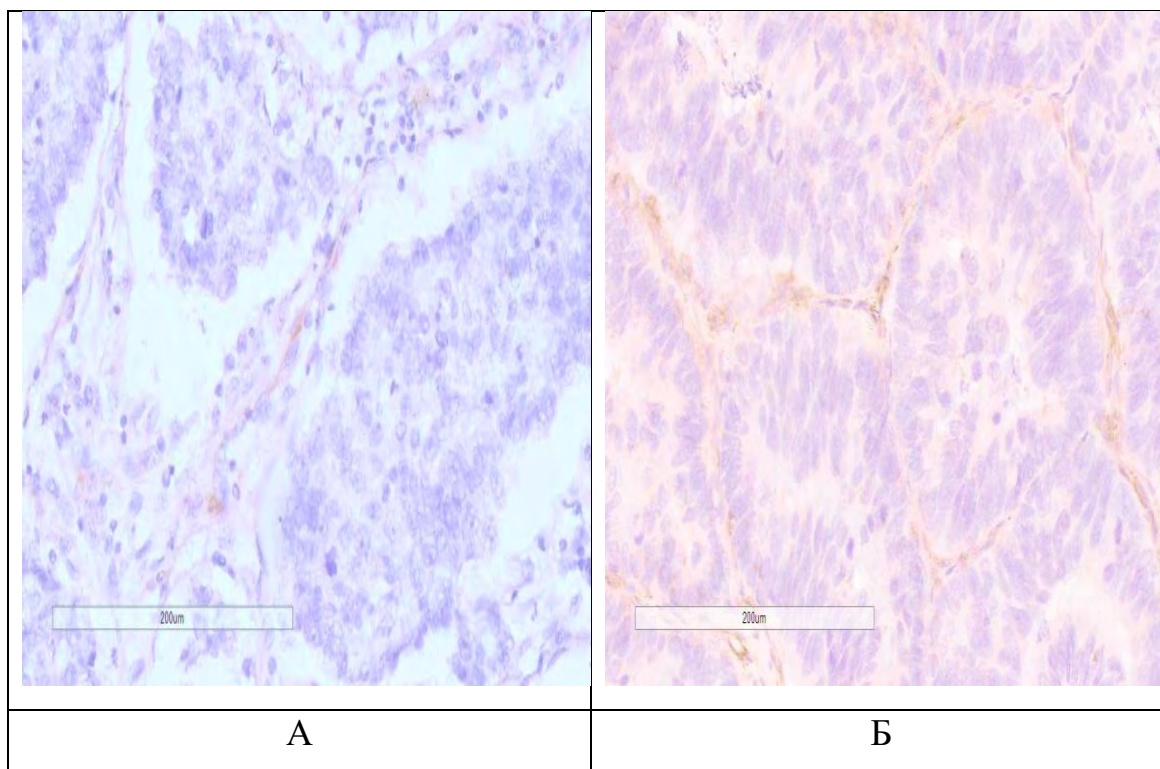


Рисунок 7. Экспрессия кальдесмона при низкой (А) и высокой (Б) степени дифференцировки аденокарциномы легкого. X200.

Как видно из табл. 6, наблюдается монотонное повышение относительной площади экспрессии как киспептина, так и кальдесмона и снижение относительной площади экспрессии

матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 при переходе опухолей от низкой к высокой степени дифференцировки (рис. 7-9).

Кроме того, была установлена обратная взаимосвязь ( $R=-0,5$ ,  $p<0,05$ ) между наличием метастазов и относительной площади экспрессии киспептина и кальдесмона, а также прямая взаимосвязь ( $R=0,4$ ,  $p<0,05$ ) между наличием метастазов и относительной площадью экспрессии матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 (табл. 7.)

По данным табл. 7 при наличии метастазирования были обнаружены более высокие уровни экспрессии как киспептина, так и кальдесмона, и более низкие уровни экспрессии матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 ( $p<0,05$ ).

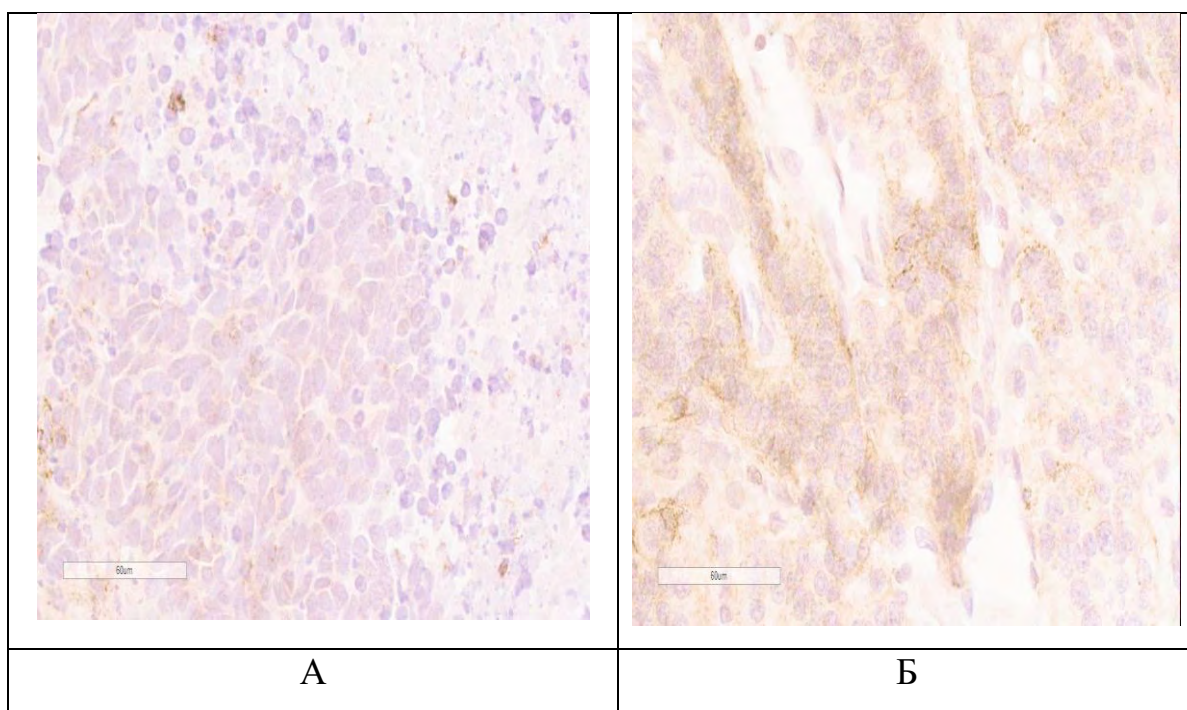


Рисунок 8. Экспрессия киспептина при низкой (А) и высокой (Б) степени дифференцировки аденокарциномы легкого. X200.

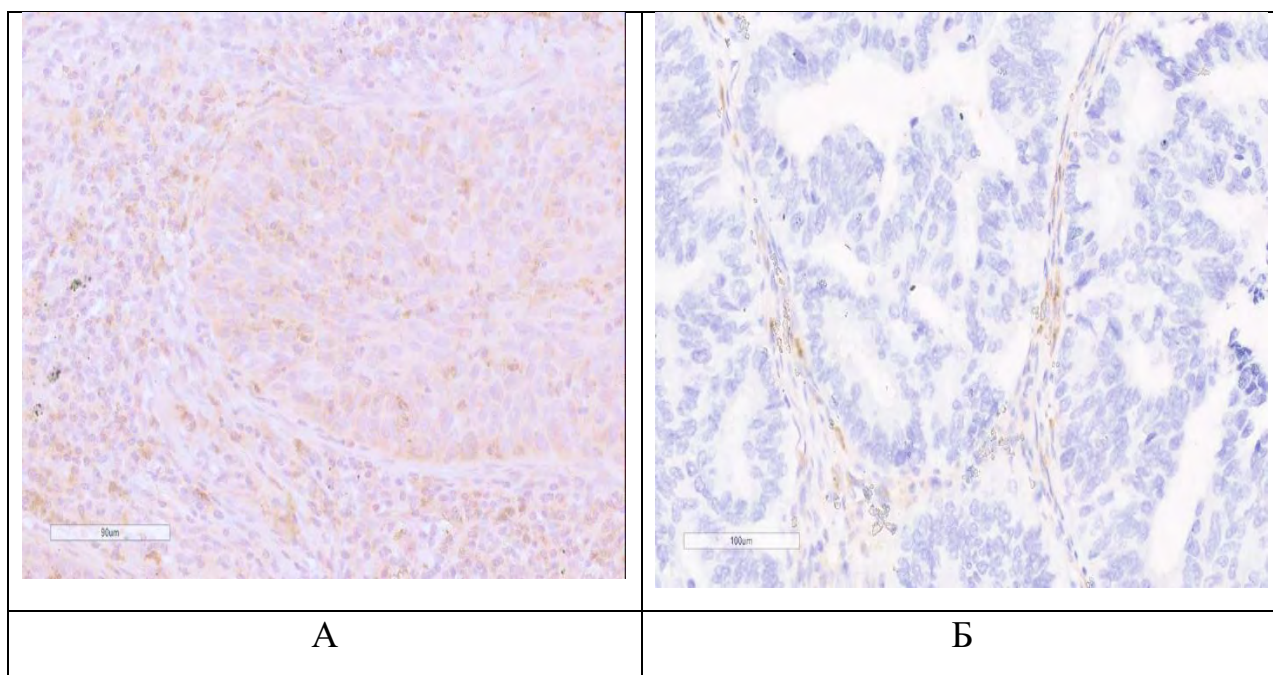


Рисунок 9. Экспрессия матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 при низкой (А) и высокой (Б) степени дифференцировки аденокарциномы легкого. Х200.

Таблица 7. Относительная площадь экспрессии сигнальных молекул (%) и наличия метастазирования опухоли.

Иммуногистохимические показатели	Метастазирование	
	Наличие	Отсутствие
Киспептин*	25,0±3,4	11,6±2,4
Кальдесмон*	11,8±1,2	6,3±1,2
Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 4	4,1±2,6	7,3±0,9

Примечание: \*Различия в показателях при  $p < 0,05$  при сравнении наличия и отсутствия метастазирования

Оценка вторичных изменений, сопровождающих канцерогенез, показала, что на первом месте – 24 (70,6 %) было воспаление, на втором – 23 (67,6 %) некроз и на третьем – 20 (58,8 %) кровоизлияния.

Анализ лимфо-васкулярной инвазии, как предшественника метастазирования, позволил выявить связь с вторичными изменениями, сопровождающими канцерогенез.

Вторичные изменения, сопровождающие лимфо-васкулярную инвазию представлены в табл. 8.

Таблица 8. Вторичные изменения при лимфо-васкулярной инвазии.

Вторичные изменения	Лимфо-васкулярная инвазия			
	Наличие		Отсутствие	
	Абс	%	Абс	%
Некроз*	20	87,0	3	27,3
Кровоизлияния*	18	78,3	2	18,2
Воспаление*	19	82,6	5	45,5

Примечание: \*Различия проявления вторичных проявлений при наличии и отсутствии лимфо-васкулярной инвазии при  $p < 0,05$

Выявленные в ходе исследования различия в уровне дифференцировки опухолей, относительной площади экспрессии кисспептина, кальдесмона и матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 в группах, различающихся по наличию метастазирования, позволили предположить существование факторов, способствующих прогнозу метастазирования.

Как видно из табл. 8, частота вторичных изменений (некроза, воспаления и кровоизлияния) статистически значимо выше при лимфо-васкулярной инвазии.

Таблица 9. Интегральные показатели относительной площади экспрессии (%) иммуногистохимических маркеров и степени дифференцировки опухоли.

Иммуногистохимические показатели	Степень дифференцировки		
	Низкая	Умеренная	Высокая
Кисспептин*	0,3±0,2	9,9±2,8	22,6±2,2
Кальдесмон*	0,4±0,2	5,9±2,8	10,5±1,1
Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 4*	18,4±2,3	8,6±1,5	0,5±0,3
Примечание: *различия в показателях при $p < 0,05$ при переходе от низкой к умеренной и высокой степени			

В ходе проведенного дискриминантного анализа был установлен фактор (кисспептин), позволяющий осуществлять прогноз, разделяя группы с наличием и отсутствием метастазирования на основании дискриминантных функций (1,2).

$$P1 = 0,6 \cdot K - 10 \quad (3.1)$$

$$P2 = 0,3 \cdot K - 1,9 \quad (3.2)$$

где – P1 и P2 – дискриминантные функции, позволяющие осуществить прогноз наличия (P1) и отсутствия (P2) метастазирования, K – площадь экспрессии кисспептина (в %).

Исследование показало правильную оценку прогноза в 91,1% случаев, однако в группе с метастазированием правильный прогноз



был меньше – в 75% случаев, что требует дальнейших исследований в данном направлении.

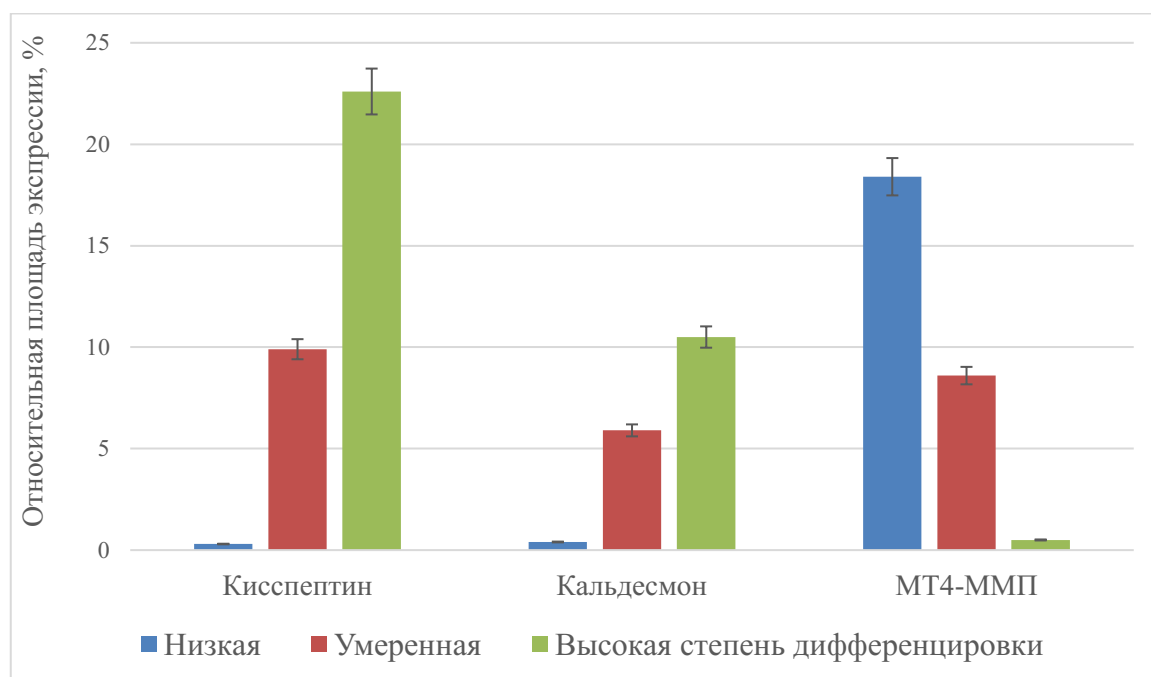


Рисунок 10. Показатели экспрессии сигнальных молекул в опухолевой ткани при различной степени дифференцировки новообразований.

Таблица 10. Относительная площадь экспрессии иммуногистохимических маркеров (%) и наличие метастазирования опухоли.

Иммуногистохимические показатели	Метастазирование	
	Наличие	Отсутствие
Киспептин*	25,0±3,4	11,6±2,4
Кальдесмон*	11,8±1,2	6,3±1,2
Матриксная металлопротеиназа мембранного типа 4	4,1±2,6	7,3±0,9

Примечание: \*различия в показателях при  $p < 0,05$  при сравнении наличия и отсутствия метастазирования



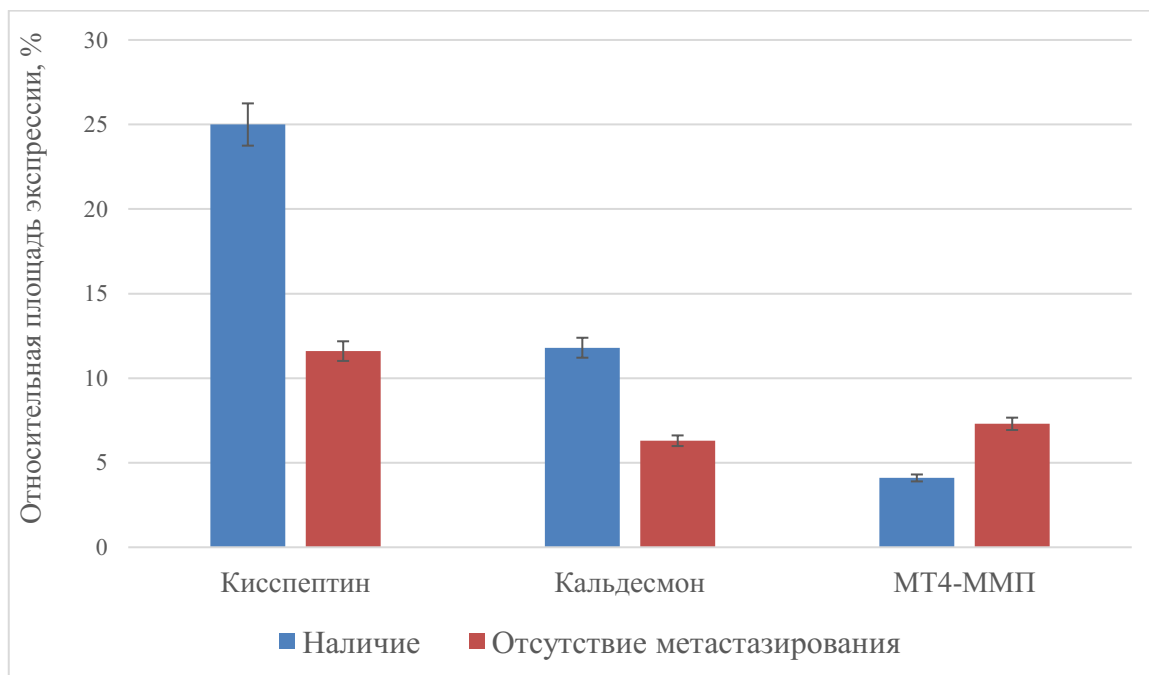


Рисунок 11. Показатели экспрессии сигнальных молекул в опухолевой ткани при наличии/отсутствии метастазирования.

Таблица 11. Вторичные изменения при лимфо-васкулярной инвазии.

Вторичные изменения	Лимфо-васкулярная инвазия			
	Наличие		Отсутствие	
	Абс	%	Абс	%
Некроз*	20	87,0	3	27,3
Кровоизлияния*	18	78,3	2	18,2
Воспаление*	19	82,6	5	45,5

Примечание: \*Различия проявления вторичных проявлений при наличии и отсутствии лимфо-васкулярной инвазии при  $p < 0,05$

Таким образом, в ходе исследования установлено, что вторая степень дифференцировки опухоли приходилась на старшие возраста.

Выявлено монотонное возрастание относительной площади экспрессии как киспептина, так и кальдесмона и монотонное снижение относительной площади экспрессии матриксной металлопротеиназы мембранного типа 4 при переходе от низкой к высокой степени дифференцировки.

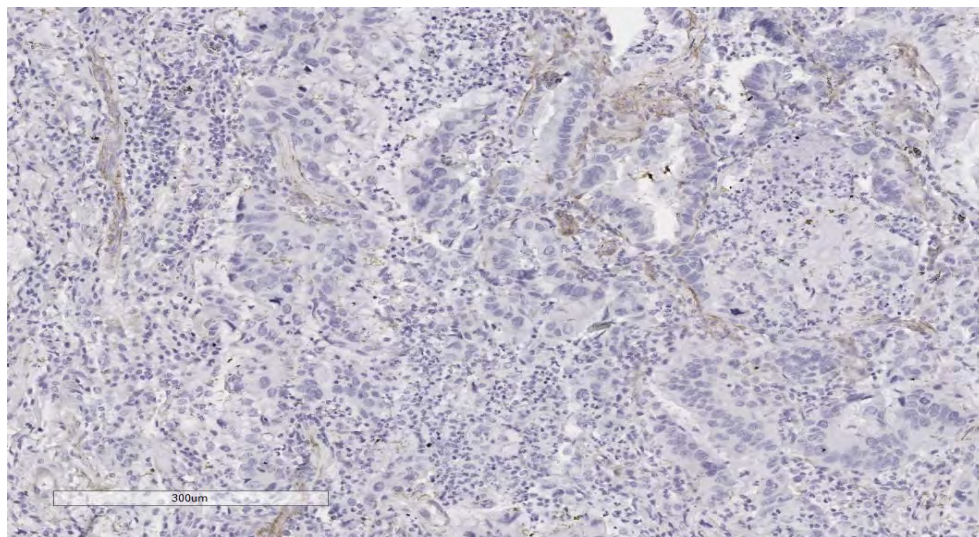


Рисунок 12. Выраженная экспрессия киспептина при высокой степени дифференцировки аденокарциномы легкого. X200.

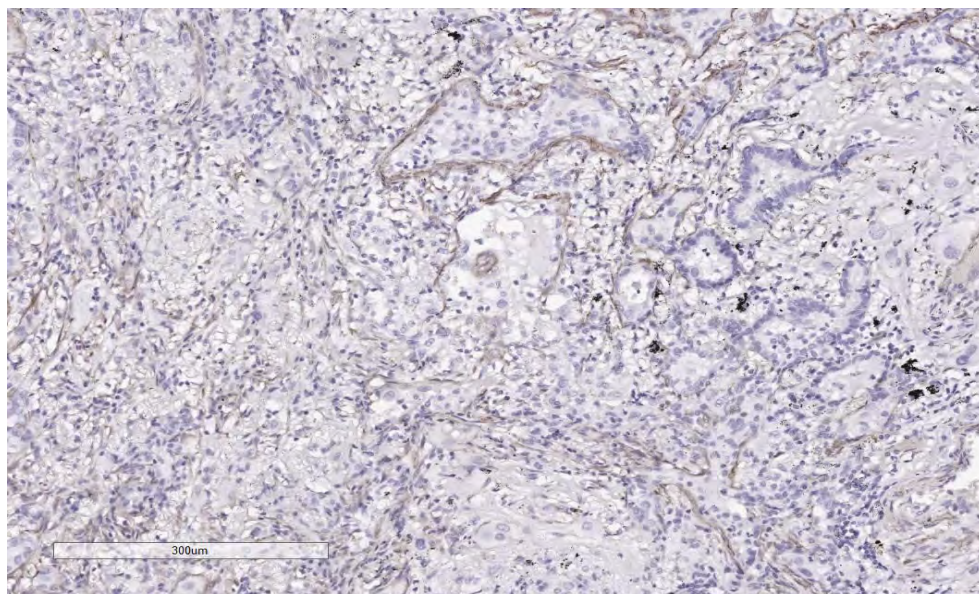


Рисунок 13. Выраженная экспрессия кальдесмона при высокой степени дифференцировки аденокарциномы легкого. X200.

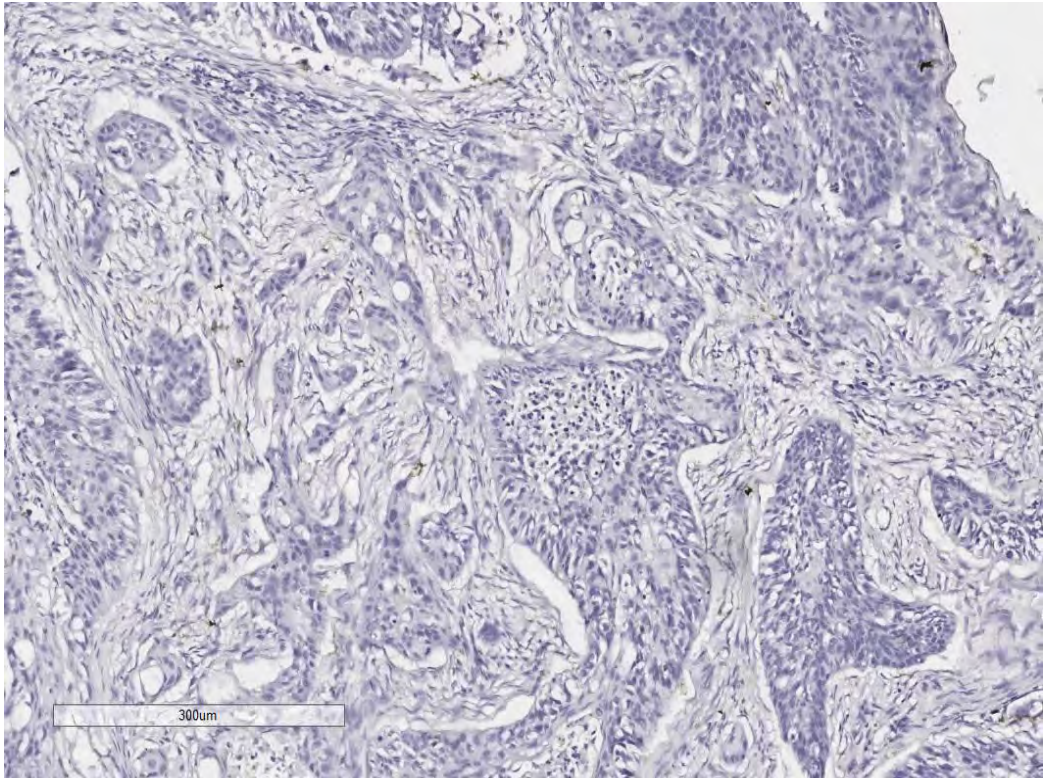


Рисунок 14. Низкий уровень экспрессии MT4-ММП при высокой степени дифференцировки аденокарциномы легкого. X200.

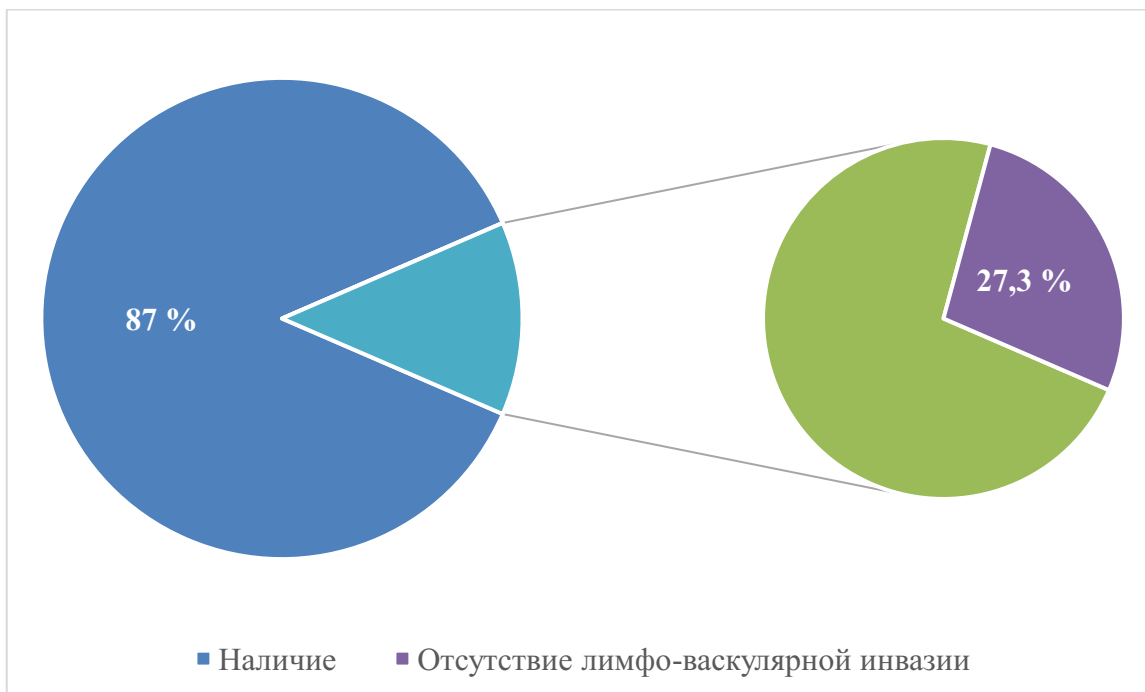


Рисунок 15. Суммарные показатели экспрессии сигнальных молекул в опухолевой ткани при некрозе опухолей.



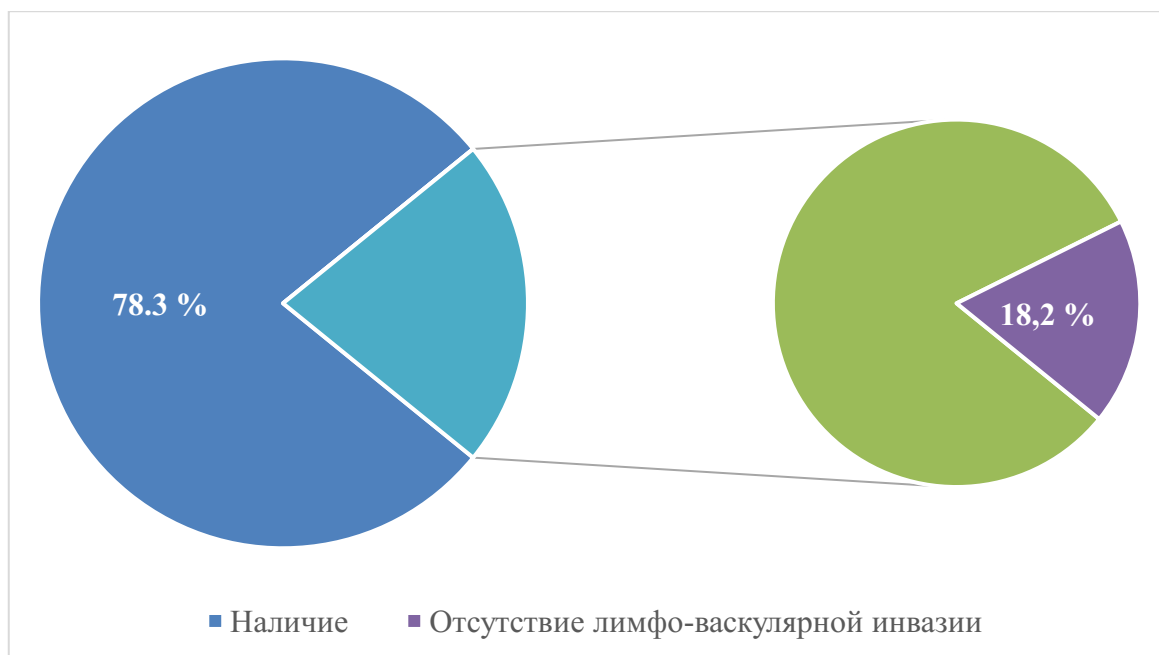


Рисунок 16. Суммарные показатели экспрессии сигнальных молекул в опухолевой ткани при кровоизлияниях в ткани опухолей.

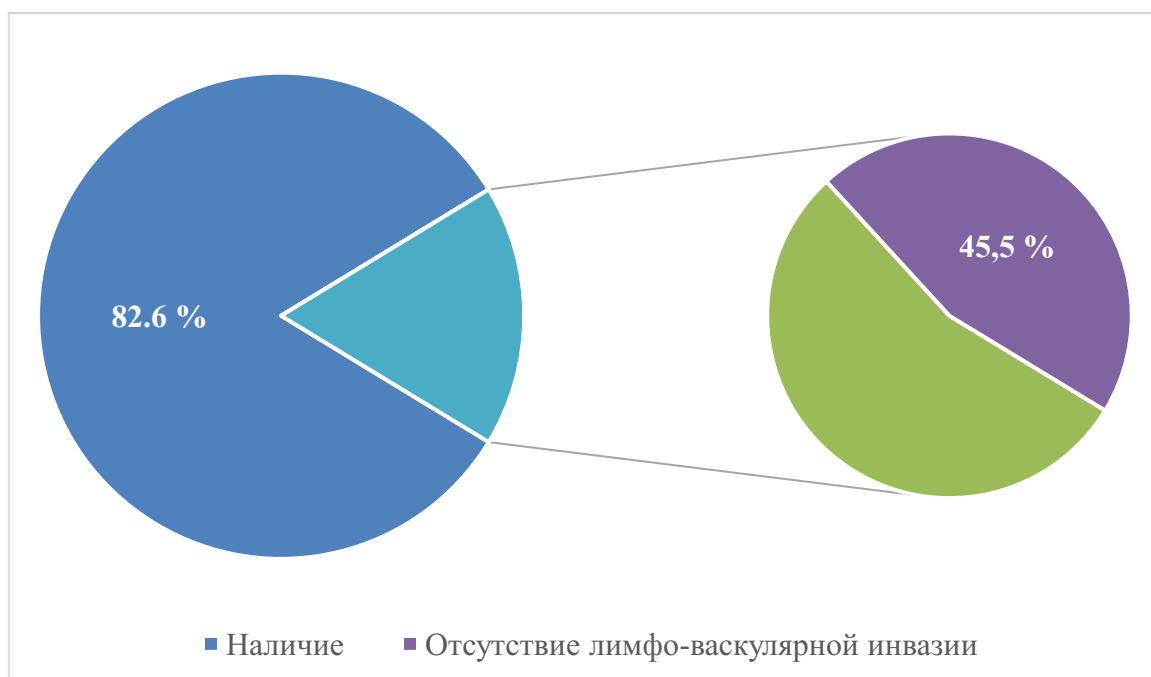


Рисунок 17. Суммарные показатели экспрессии сигнальных молекул в опухолевой ткани при воспалении в ткани опухолей.

Показана взаимосвязь между степенью дифференцировки опухоли и относительной площадью экспрессии киспептина,

кальдесмона и матричной металлопротеиназы мембранного типа 4. Определена взаимосвязь между метастазированием и относительной площадью экспрессии киспептина, кальдесмона и матричной металлопротеиназы мембранного типа 4 (рис. 10-14). Подтверждено, что вторичные изменения (воспаление, кровоизлияние и некроз) встречаются статистически значимо чаще при лимфо-васкулярной инвазии (табл. 9-11, рис. 15-17).

### **3.4. Оценка прогноза метастазирования карцином легкого**

Выявленные в ходе исследования различия в уровне дифференцировки опухолей, относительной площади экспрессии киспептина, кальдесмона и матричной металлопротеиназы мембранного типа 4 в группах, различающихся по наличию метастазирования, позволили предположить о существовании факторов, способствующих прогнозу метастазирования.

При прогнозировании метастазирования вся исследуемая совокупность (34 человек) была разделена на две подгруппы: обучения – 38,2 % (13 человек), и проверки – и 61,8 % (21 человек). Информативность признаков оценивали с помощью коэффициента Кульбака.

Диагностические критерии (при  $R$  не менее 1) представлены в табл. 12.

Наиболее информативными признаками, позволяющими прогнозировать метастазирование явились: относительная площадь экспрессии киспептина и кальдесмона (у обоих по  $R=2,0$ ), степень дифференцировки опухоли по grade ( $R=1,3$ ).

Таблица 12. Диагностические коэффициенты для прогнозирования возникновения метастазирования (фрагмент диагностической таблицы).

Коэфф. Кульбака R	Вопросы диагностической таблицы	Диагностические коэффициенты
1,3	Дифференцировка опухоли по grade: 1) низкая 2) умеренная и высокая	1) 2,6; 2) -2,6
2,0	Относительная площадь экспрессии киспептина (%): 1) Менее 18; 2) 18 и более	1) -3,0; 2) 3,3
2,0	Относительная площадь экспрессии кальдесмона (%): 1) Менее 9; 2) 9 и более	1) -3,2; 2) 3,8

Подсчитывая диагностические коэффициенты получали результирующий диагностический коэффициент. Положительный коэффициент свидетельствовал о высоком риске метастазирования, отрицательный коэффициент – о низком.

Проведен сравнительный анализ с группой проверки. Правильный результат был определен у 81 % случаев (табл. 13).

В ходе проведенного дискриминантного анализа был установлен фактор (киспептин), позволяющий осуществлять прогноз, разделяя группы с наличием и отсутствием метастазирования на основании дискриминантных функций (1,2).

$$P1 = 0,6 \cdot K - 10 \quad (3.1)$$

$$P2 = 0,3 \cdot K - 1,9 \quad (3.2)$$

где – P1 и P2 – дискриминантные функции, позволяющие осуществить прогноз наличия (P1) и отсутствия (P2) метастазирования, K – площадь экспрессии киспептина (в %).

Исследование показало правильную оценку прогноза в 91,1 % случаев, в основном за счет высокой (96,5%) специфичности, однако правильный прогноз в группе с метастазированием был 60 %, что требовало дальнейших исследований в данном направлении.

Таблица 13. Результаты проверки диагностической таблицы прогнозирования метастазирования на группе проверки.

Показатель	Группа проверки	
	Относительные значения, %	Количество человек
Чувствительность	100	2
Специфичность	84	16
Ложноотрицательный ответ	0	0
Ложноположительный ответ	16	3

Особенностью построенных моделей А. Вальда в модификации Е.В. Гублера и дискриминантного анализа является предположение о линейности взаимодействия факторов внутри модели. Эта особенность может существенно снизить правильность прогноза, поэтому для устранения этих недостатков, была выбрана нейросетевая модель, а входные параметры, использовавшиеся ранее в модели А. Вальда, были использованы для ее построения и обучения.

Структура нейронной сети включала входной слой из 3 нейронов, скрытые слои из 4 и 6 нейронов, и выходной из одного нейрона (рис. 18).

Обучение нейронной сети осуществляли методами обратного распространения ошибки и сопряженных градиентов. Из всей совокупности были сформированы три группы, из них две непосредственно участвовавших в обучении: группа обучения (18

человек) и контроля (8 человек), а также группа тестирования (проверки) – 8 человек. Правильный результат в группе обучения составил 100 %, контроля 100 % и тестирования – 100%.

Результаты проверки нейронной сети на группе тестирования представлены в табл. 14.).

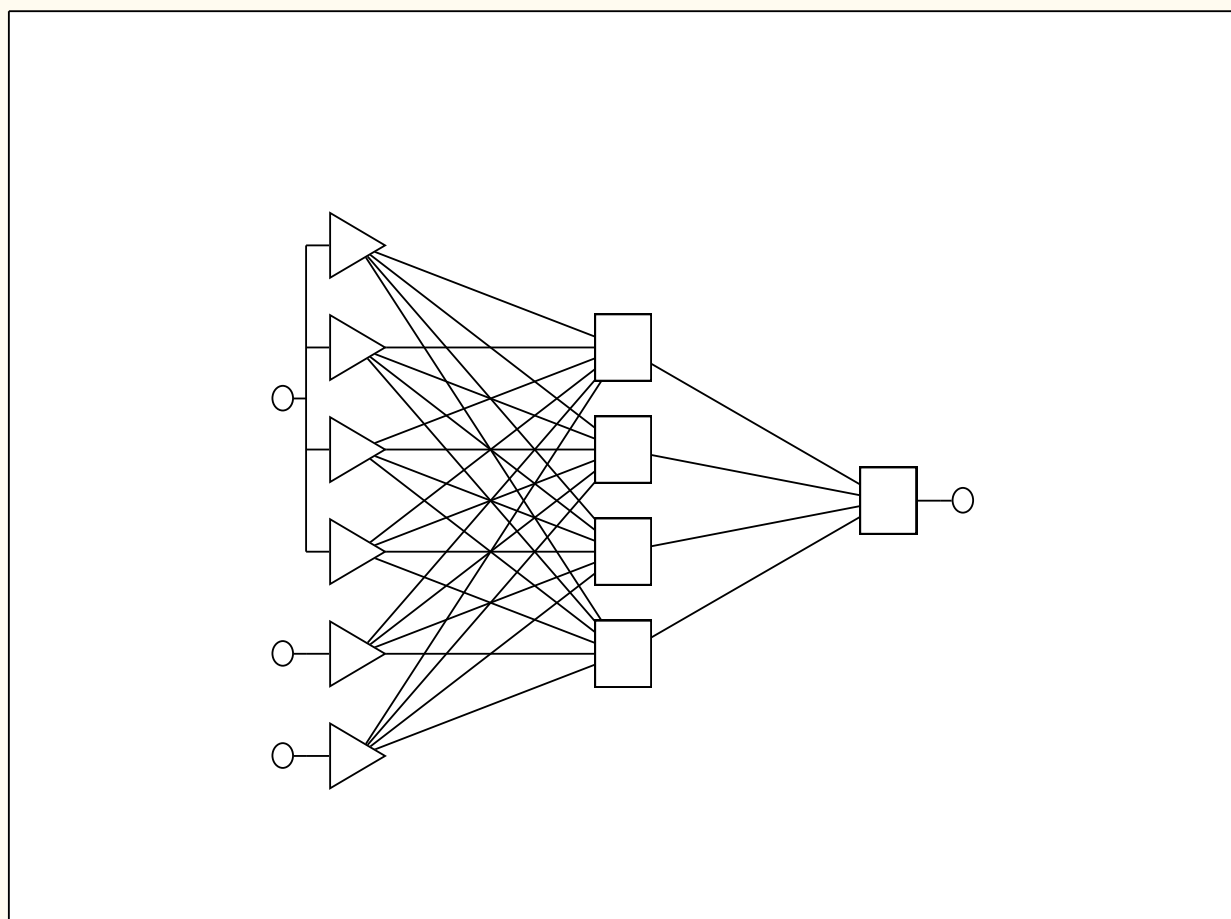


Рисунок 18. Структура нейронной сети, прогнозирующей метастазирование.

Чувствительность нейронной сети составила 100 %, специфичность – 100 %. Чувствительность отдельных переменных в нейросетевой модели определяли как отношение ошибок нейронной сети на группе тестирования без интересующего нас факториального признака к ошибкам сети с интересующим факториальным признаком. Чем больше чувствительность, тем большее значение



играет исследуемый предиктор, тем меньше ошибка прогноза нейронной сети.

Информативная ценность факторов, входящих в нейронную сеть представлена в табл. 15.

Таблица 14. Результаты проверки нейронной сети прогнозирования метастазирования на группе тестирования.

Показатель	Группа тестирования	
	Относительные значения, %	Количество человек
Чувствительность	100	1
Специфичность	100	7
Ложноотрицательный ответ	0	0
Ложноположительный ответ	0	0

Таблица 15. Результаты анализа чувствительности предикторных факторов нейронной сети.

Фактор	Чувствительность	Ранг
Относительная площадь экспрессии кисспептина	54	1
Вторичные проявления: некроз	18	2
Наличие лимфо-васкулярной инвазии	16	3

При прогнозировании метастазирования с помощью нейронной сети, наиболее информативным фактором были относительная

площадь экспрессии кисспептина, на втором месте – наличие некроза, как вторичного проявления опухолевого процесса.

Выяснено, что выбранная модель обработки позволяет правильно прогнозировать случаи метастазирования в 81%, а дискриминантный анализ – в 91% случаев. В то же время, учет нелинейности взаимоотношений относительной площади экспрессии кисспептина, вторичных проявлений опухолевого процесса позволил увеличить правильность прогноза метастазирования до 100%.

Большинство работ рассматривает кисспептины (и особенно, KiSS-1) как мощный внутриклеточный ингибитор опухолевой прогрессии и метастазирования, действующий в основном за счет обусловленной ими деградации матричных металлопротеиназ, особенно MMP-4 и 9 (рис. 19).

Однако, следует отметить, что кисспептины играют неоднозначную роль при развитии различных новообразований. Так, например, KiSS-1 стимулирует метастазирование при гепатоцеллюлярной карциноме и раке молочной железы, что, возможно, связано с нарушениями синтеза эстрогенов при этих опухолях.

Более того, общепризнано, что гетерогенность опухолевых клеток может вызывать различия в скорости роста опухоли, способности к инвазии, чувствительности к лекарствам и прогнозе развития новообразования. Было обнаружено, что KiSS-1R активируются в мезенхимальных стволовых клетках и остеобластах при их совместном культивировании с клетками множественной миеломы. Перекрестные связи между опухолевыми клетками и микроокружением костной ткани показали, что KiSS-1 может рассматриваться в качестве вероятного биомаркера для оценки прогрессии множественной миеломы. (по его экспрессии можно

оценивать активность фибробластов, эндотелиоцитов и инфильтрирующих опухоль лимфоцитов).

Таким образом, можно предположить, что паттерн экспрессии КР в каждом конкретном случае способствует функционированию микроокружения опухоли и, тем самым, представляет собой мишень для оптимизации таргетной терапии злокачественных новообразований.

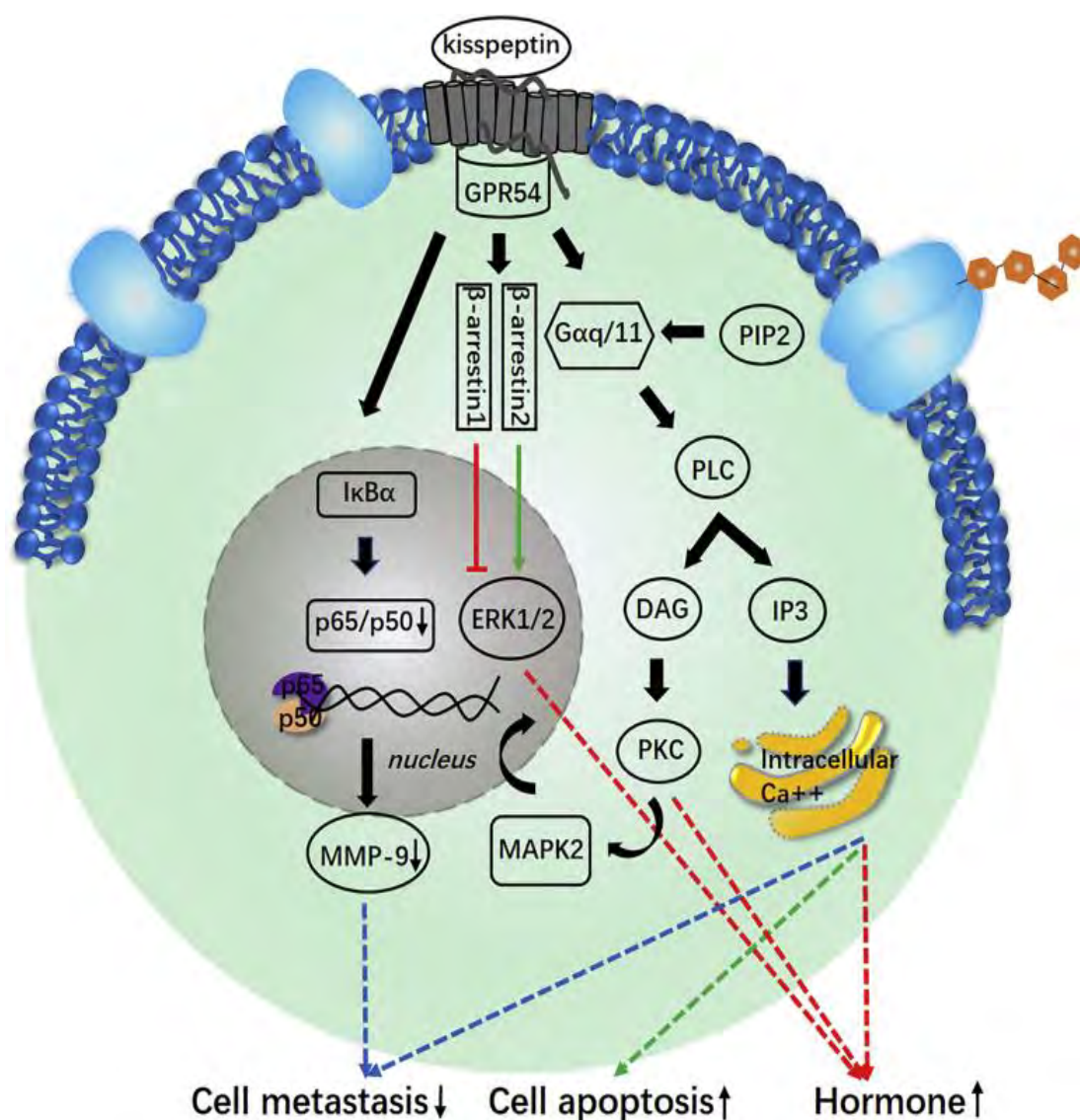


Рисунок 19. Схема участия KiSS-1 во внутри/ и межклеточных метаболических процессах [26].

Метастазирование опухоли представляет собой сложный процесс, включающий потерю межклеточной адгезии, инвазию во внеклеточный матрикс, распространение через лимфатические или сосудистые каналы и колонизацию в месте метастазирования, где вторичные опухоли продолжают расти и усугубляют первичное развитие новообразования. Показано, что в процесс метастазирования вовлечены изменения онкогенов и генов-супрессоров опухолей. При этом установлено, что процесс метастазирования зависит от определенного класса белков, которые играют важную роль в подавлении метастатического фенотипа. Эти белки кодируются генами-супрессорами метастазирования, определяемыми как гены, подавляющие метастазирование *in vivo* без ингибирования роста первичной опухоли.

Ген KISS1, первоначально идентифицирован в культуре клеток меланомы Lee et al. в 1996 г. Авторы указали, что он действует как ген-супрессор метастазирования при ряде злокачественных новообразований, включая опухоли щитовидной железы, печени, желудка, пищевода, почек и мочевого пузыря. Считается, что функция супрессора метастазирования реализуется путем ингибирования хемотаксиса и локальной инвазии злокачественных клеток. Интересно, что KISS1, по-видимому, участвует в регуляции активности коллагеназы, которая разрушает внеклеточный матрикс, что важно при метастазировании.

Экспрессия и функция KISS1 специфичны для клеток, тканей и органов. Сообщается, что экспрессия KISS1 при раке пищевода с метастазами в лимфатические узлы была значительно ниже, чем при опухолях без метастазов. Аналогичные данные представлены в исследованиях динамики прогрессии рака щитовидной железы. Напротив, повышение экспрессии KISS1 зарегистрировано у больных

раком молочной железы с агрессивными опухолями и высокой смертностью.

Было показано, что MMP-4 и 9 участвуют в деградации внеклеточного матрикса и способствует росту опухоли и метастазированию, благодаря своим ангиогенным свойствам. Обнаружено, что экспрессия этих маркеров коррелирует со стадией опухолевого процесса, метастазированием в лимфатические узлы и выживаемостью. Между показателями экспрессии KISS1 и MMP-4 и 9 наблюдалась обратная зависимость. Экспрессия KISS1 была значительно выше на стадии I-II опухолевого роста по сравнению со стадией III-IV, что указывает на обратную взаимосвязь между экспрессией KISS1 и прогрессированием немелкоклеточного РЛ.

Кроме того, экспрессия KISS1 была значительно выше в первичных опухолях по сравнению с метастазами, что подтверждает представление о том, что KISS1 действует как супрессор метастазирования при РЛ.

Полученные нами результаты показывают, что KISS1 и MMP-4 могут служить информативными биомаркерами для оценки метастатического потенциала и прогноза у пациентов с РЛ.

Механизмы подавления выработки KISS1 в процессе метастазирования опухолей полностью невыяснен. Потеря гетерозиготности в области хромосомы 6q16.3-q23 коррелировала со снижением экспрессии KISS1. Интересно, что утрата гетерозиготности на хромосоме 6q16.3 была идентифицирована в некоторых случаях РЛ, что указывает на сходный механизм этого явления в регуляции экспрессии KISS1 при раке легкого. Снижение экспрессии KISS1 было связано с прогрессированием рака и метастазированием других локализаций, так обнаружено, что опухоли желудка с низкой экспрессией KISS1 часто имели отдаленные метастазы и рецидивировали. Кроме того, выживаемость пациентов с

опухолями, экспрессирующими низкий уровень KISS1, была значительно ниже, чем у больных с высокой экспрессией. Также показано, что высокая экспрессия KISS1 является независимым прогностическим показателем безрецидивной и общей выживаемости у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой.

Роль MMP-4 и 9 в деградации внеклеточного матрикса и стимуляции ангиогенеза и роста метастатических опухолевых клеток хорошо известна. Экспрессия MMP-4 и 9 возрастала с размером опухоли и ее экспрессия была значительно выше в случаях РЛ с метастазами по сравнению с пациентами без метастазов. Кроме того, экспрессия MMP-4 и 9 была значительно выше при метастазах в лимфатические узлы, чем при первичных поражениях. В совокупности эти результаты подтверждают мнение о том, что MMP-4 и 9 играют важную роль в прогрессии РЛ.

Также обнаружена обратная связь между экспрессией белков KISS1 и MMP-4. Эти данные свидетельствуют о том, что KISS1 оказывает ингибирующее действие на процесс метастазирования РЛ, в то время как MMP-4 стимулирует метастазирование. Дисбаланс между экспрессией этих двух белков, по-видимому, является важной причиной распространения РЛ. Выживаемость у пациентов с низкой экспрессией KISS1 была ниже, чем у пациентов с высокой экспрессией KISS1, тогда как низкая экспрессия MMP-4 указывала на благоприятный прогноз. Таким образом, оценка экспрессии KISS1 и MMP-4 несет важную прогностическую информацию для пациентов с РЛ.

В последние годы появляются сведения о роли нового представителя семейства металлопротеиназ - MMP-26, экспрессия которой также тесно ассоциирована с экспрессией КР. MMP-26 впервые клонирована из библиотеки кДНК опухолей эндометрия человека в 2000 г. 3-х геномный ген MMP-26 локализован в локусе

11p15.3 и он кодирует белок массой 30 кДа, состоящий из 261 аминокислотного остатка. Было показано, что ММП-26 расщепляет несколько компонентов внеклеточного матрикса, включая фибронектин, коллаген IV типа, витронектин, желатин и фибриноген, а также белки, не входящие в матрикс, такие как инсулино-подобный белок-1, трансформирующий фактор роста, ингибитор  $\alpha$ -1 протеазы.

Эти свойства отражают возможную ключевую роль ММП-26 для прогрессии опухоли и формирования ее ангиогенеза. Описано, что экспрессия ММП-26 значительно выше в тканях карцином различных локализаций, чем в нормальных тканях, хотя паттерны экспрессии различаются между собой в различных тканях. Экспрессия ММП-26 в тканях плоскоклеточного рака пищевода и карциномы яичников значительно выше при инфильтративных карциномах, чем при неинвазивных опухолях; в то же время экспрессия ММП-26 в молочной железе и простате значительно выше при преинвазивных карциномах, чем при инфильтрирующих опухолях.

Показано, что уровень экспрессии ММП-26 достоверно выше в ткани карциномы легкого, чем в нормальной легочной ткани, что отражает возможную роль гиперэкспрессии ММП-26 в развитии РЛ.

Также обнаружено, что высокий уровень экспрессии ММП-26 составил 87,5% у пациентов с метастазами в лимфатические узлы, в то время как у больных без метастазов подобный уровень регистрировался только в 26,4%, что указывает на существенную роль ММП-26 в метастазировании РЛ. При этом механизмы гиперэкспрессии ММП-26, способствующие инвазии и метастазированию раковых клеток остаются неясными.

Отмечается, что функционально блокирующие специфические антитела (анти-ММП-26 и анти-ММП-9), снижают инвазивность

опухолевых клеток ARCaP через стабилизацию фибронектина и коллагена IV типа.

Установлено, что при РЛ экспрессия ММП-26 значительно выше на стадии III–IV развития опухоли, чем у больных РЛ на I–II стадии. Кроме того, показано, что более высокая экспрессия ММП-26 коррелирует с рецидивом опухоли, а низкая – с безрецидивной выживаемостью. Экспрессия ММП-26 в значительной степени коррелирует с глубиной инвазии опухоли, метастазированием в лимфатические узлы и отдаленным метастазированием.

Показано, что ММП-9 секретируется различными клетками в инактивированной форме в виде пропептида с молекулярной массой 10 кДа, который может быть активирован другими ММП или системой тканевого активатора плазминогена (tPA)-плазмин из-за его биологической функции расщепления желатина, что способствует подвижности злокачественных клеток.

Во многих исследованиях ММП-9 рассматривалась как важный прогностический маркер и терапевтическая мишень рака. Фундаментальные исследования показали, что высокая экспрессия ММП-9 положительно связана с агрессивностью злокачественных клеток в солидных опухолях. За исключением его хорошо известной функции деградации внеклеточного матрикса, исследования *in vivo* на мышах с дефицитом ММП-9 показали, что метастазирование опухоли усиливается за счет имплантации экспрессии ММП-9 в костный мозг, что может способствовать ангиогенезу для облегчения миграции раковых клеток.

Кроме того, ММП-9 может быть получен из стромальных клеток, таких как воспалительные клетки и фибробласты [31, 32]. Кроме того, хотя ММП-9 является растворимым ферментом, он также может связываться с CD44, чтобы активировать путь TGF- $\beta$  для усиления ангиогенеза и перехода эпителия в мезенхиму [33, 34], а



также может подавлять экспрессию E-кадгерина как фактор транскрипции [35].

Хотя все вышеупомянутые данные убедительно подтверждают тот факт, что MMP-9 может усиливать агрессивность рака, все еще остаются разногласия среди клинических наблюдательных исследований. Ретроспективный анализ не обнаружил какой-либо значимой корреляции между общей экспрессией MMP-9 в сыворотке и клинико-патологическими особенностями или выживаемостью. Поскольку активность MMP-9 не могла быть обнаружена с помощью ИФА, был проведен желатиновый зимографический анализ, а высокая активность MMP-9 была фактором риска поздней стадии опухоли и отдаленных метастазов.

Был проведен метаанализ для определения прогностической ценности MMP-9 при НМРЛ; однако ни одно из включенных исследований не определяло его активность в тканях или сыворотке. Наш систематический анализ показал, что экспрессия MMP-9 в опухолевой ткани была положительно связана с категорией T, стадией опухоли и 3-летней и 5-летней ОВ, в то время как высокий уровень MMP-9 в сыворотке не был связан ни с одним из этих факторов. параметры.

Прирост циркулирующей MMP-9 высвобождается опухолевыми или стромальными клетками, и ее активность может подавляться многими внеклеточными факторами, такими как MMP-1, 3, 7, 10, 26, трипсин-2 и нейтрофильная эластаза [37]. Среди них тканевые ингибиторы металлопротеиназ 1 (TIMP1) являются наиболее важными эндогенными ингибиторами MMP-9. TIMP1 принадлежит к семейству белков, естественным образом ингибирующих MMP, которое состоит из четырех членов (TIMP1, TIMP2, TIMP3 и TIMP4).

Фактически, несколько исследований показали, что TIMP1 не только блокирует внеклеточный эффект расщепления MMP-9, но

также ингибирует процесс отщепления мембранных белков и регуляторный эффект клеточного сигнала MMP-9 [38-40]. Хотя анти-MMP-9 поведение изначально привело к тому, что TIMP1 рассматривался как ген, подавляющий опухоль, позже исследователи обнаружили, что TIMP1 также функционирует независимо от MMP-9, способствуя росту опухоли и ингибируя апоптоз [41].

Экспрессия TIMP1 была увеличена в солидных опухолях, таких как рак легкого, рак молочной железы и колоректальный рак, и была признана фактором риска неблагоприятного исхода [42-44]. Его высокая экспрессия не только препятствует активности MMP-9, но и потенцирует агрессивность злокачественных клеток. Основываясь на наших собственных данных и проведенном здесь метаанализе, активность MMP-9 в сыворотке была связана со стадией опухоли и статусом метастазирования, но ее общая экспрессия в сыворотке не была связана с клинико-патологическими параметрами или выживаемостью. Следовательно, активность циркулирующей MMP-9 может быть непропорциональной количеству, обнаруженному с помощью ELISA.

Все эти данные позволяют рассматривать семейство MMP в качестве потенциально значимых биомаркеров для мониторинга прогрессии оценки прогноза развития РЛ и других опухолей.

В целом, проведенные нами исследования профиля экспрессии KiSS-1 показали, что гиперэкспрессия KiSS-1 и его рецептора коррелирует с прогрессией РЛ.

Полученные нами и другими исследователями данные позволяют считать, что KiSS-1, кроме его диагностической значимости как биомаркера, может являться потенциальной молекулярной мишенью для таргетной терапии с целью снижения риска метастазирования карциномы легкого.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы наблюдается рост выполняемых ИГХ-исследований, в ходе которых проводится определение экспрессии потенциальных маркеров злокачественности. Значимыми маркерами для первичной диагностики опухолей легких являются: СК7, СК20, тиреоидный фактор транскрипции TTF-1, хромогранин А, синаптофизин, CD56; белки сурфактанта; p63, СК5/6 и кисспептины.

Большой интерес представляют кисспептины. Подавление экспрессии KISS1 описано также при прогрессировании карцином легкого и их метастазированием. Сигнальная система KISS1/KISS1R может служить регулятором метастазирования опухолей и является потенциальным прогностическим маркером опухолевых процессов. Однако, пока кисспептинам и их роли в патологии дыхательной системы (в частности, опухолей легких) посвящено малое количество работ.

Анализ данных литературы свидетельствует об актуальности и своевременности изучения кисспептинов и ассоциированных с ними сигнальных молекул в качестве модуляторов опухолевого роста в целом (и, в частности, образования и развития рака легких). В этом контексте их также следует рассматривать как потенциально возможных биомаркеров для оптимизации молекулярной диагностики различных типов рака легких и персонифицированной оценки прогноза их развития.

В этой связи актуальность выбранной темы исследования состоит в проведении углубленного изучения экспрессии кисспептинов и ассоциированных с ним молекул в карциномах легкого для оценки диагностического и прогностического значения кисспептинов при опухолевом росте.

В ходе исследования установлены корреляции между уровнем экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул – кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких. Выявлены корреляции между экспрессией кисспептина-1, кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких и степенью их дифференцировки. Показано монотонное возрастание экспрессии кисспептина-1 и кальдесмона и монотонное снижение ММП-4 при переходе от низкой к высокой степени дифференцировки. Определена связь между метастазированием и экспрессией кисспептина, кальдесмона и ММП-4 в опухолях легких. Установлена обратная взаимосвязь между наличием метастазов и показателями экспрессии кисспептина-1, кальдесмона, а также прямая взаимосвязь между наличием метастазов и показателями экспрессии ММП-4.

Полученные данные позволяют рассматривать семейство ММП в качестве потенциально значимых биомаркеров для мониторинга прогрессии оценки прогноза развития РЛ и других опухолей.

В целом, проведенные нами исследования профиля экспрессии KiSS-1 показали, что гиперэкспрессия KiSS-1 и его рецептора коррелирует с прогрессией РЛ.

Полученные нами и другими исследователями данные позволяют считать, что KiSS-1, кроме его диагностической значимости как биомаркера, может являться потенциальной молекулярной мишенью для таргетной терапии с целью снижения риска метастазирования карциномы легкого.

Таким образом, полученные результаты позволяют предложить алгоритм использования показателей экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4) в карциномах легкого в качестве маркеров прогрессии злокачественных опухолей.

Алгоритм заключается в следующем. При морфологическом исследовании всех видов злокачественных эпителиальных опухолей легких, кроме стандартной окраски препаратов гематоксилином-эозином, проводится иммуногистохимическое исследование экспрессии в опухолевой ткани киспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4). При положительном иммуноокрашивании на вышеуказанные биомаркеры врач-патогистолог, кроме постановки гистологического диагноза, указывает вариант возможного развития процесса по оценке показателей экспрессии киспептина-1, кальдесмона и ММП-4.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены корреляции между степенью дифференцировки карцином легкого, полом, возрастом пациентов и вторичными изменениями в новообразованиях.
2. Установлены корреляции между уровнем экспрессии киспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул – кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких.
3. Выявлены корреляции между экспрессией киспептина-1, кальдесмона и ММП-4 в карциномах легких и степенью их дифференцировки. Показано монотонное возрастание экспрессии киспептина-1 и кальдесмона и монотонное снижение ММП-4 при переходе от низкой к высокой степени дифференцировки.
4. Определена связь между метастазированием и экспрессией киспептина, кальдесмона и ММП-4 в опухолях легких. Установлена обратная взаимосвязь между наличием метастазов и показателями экспрессии киспептина-1, кальдесмона, а также прямая взаимосвязь между наличием метастазов и показателями экспрессии ММП-4.
5. Установлена возможность использования киспептина-1 как биомаркера для прогноза метастазирования карцином легкого. Учет нелинейности взаимоотношений относительной площади экспрессии киспептина и вторичных проявлений опухолевого процесса позволяет увеличить правильность прогноза метастазирования.
6. Полученные результаты позволили разработать алгоритм использования показателей экспрессии киспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4) в карциномах легкого в качестве маркеров прогрессии злокачественных опухолей.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты позволяют предложить алгоритм использования показателей экспрессии кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4) в карциномах легкого в качестве маркеров прогрессии злокачественных опухолей.

2. Алгоритм заключается в следующем: при морфологическом исследовании всех видов злокачественных эпителиальных опухолей легких, кроме стандартной окраски препаратов гематоксилином-эозином, проводится иммуногистохимическое исследование экспрессии в опухолевой ткани кисспептина-1 и ассоциированных с ним сигнальных молекул (кальдесмона и ММП-4). При положительном иммуноокрашивании на вышеуказанные биомаркеры врач-патогистолог, кроме постановки гистологического диагноза, указывает вариант возможного развития процесса по оценке показателей экспрессии кисспептина-1, кальдесмона и ММП-4.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И СИМВОЛОВ**

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЛФ – идиопатический легочный фиброз
- ИЦХ - метод – иммуноцитохимический метод
- ИГХ - метод – иммуногистохимический метод
- КП – киспептин
- КП-10 – киспептин-10
- КП-13 – киспептин-13
- ММП/ММР - металлопротеиназы
- ММП-4 – матриксная металлопротеиназа типа 4
- НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого
- ПКГ – протеинкиназа G
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РЛ – рак легкого
- РТК – рецепторные тирозинкиназы
- цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат
- DDR – рецепторы домена дискоидина
- EGFR – рецепторы эпидермального фактора роста
- Н-кальдесмон – высокомолекулярный кальдесмон
- iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота
- КР – киспептин
- KISS1R – рецептор киспептинов
- LOH – утрата гетерозиготности
- L-кальдесмон – низкомолекулярный кальдесмон
- NO – оксид азота
- OPN – остеопонтин
- TGF – фактор роста опухоли



TMA – тканевой микрочип

$\alpha$ -SMA –  $\alpha$ -гладкомышечный актин

WB – буфер для промывки образцов

$\alpha$ -SMA –  $\alpha$ -гладкомышечный актин

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Авдеев, С.Н. и др. Идиопатический легочный фиброз: федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению // Пульмонология.-2022- Т.32.- №3.- С.473-495.
2. Воротников, А.В. Роль миозин-связывающих белков в регуляции взаимодействия актина и миозина гладких мышц // Российский фонд фундаментальных исследований -1998.
3. Воротников, А.В. Крымский, М.А. Ширинский, В.П. Внутриклеточная сигнализация и фосфорилирование белков при сокращении гладких мышц // Биохимия.-2002- Т.67.- №12.- С.1587-1610.
4. Ганусевич, И.И. Роль матриксных металлопротеиназ (ММП) при злокачественных новообразованиях. Участие ММП в ангиогенезе, инвазии и метастазировании опухолей.-2010.
5. Горбунова, О.Л. Ширшев, С.В. Роль кисспептина в регуляции репродуктивной и иммунной функций // Биохимия.-2020- Т.85.- №8.- С.987-1003.
6. Григоркевич, О.С. Мокров, Г.В. Косова, Л.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы // Фармакокинетика и фармакодинамика.-2019- №2.- С.3-16.
7. Гуревич, Л.Е. и др. Прогностическое и дифференциально-диагностическое значение экспрессии цитокератинов 7 и 19 и тиреоидного фактора транскрипции-1 в нейроэндокринных опухолях легких разной степени злокачественности // Альманах клинической медицины.-2016- Т.44.- №5.
8. Данилова, В.М. и др. Кальдесмон-са<sup>2+</sup>-регуляторная белковая компонента нативных тонких филаментов гладких мышц аорты // Биополимеры и клетка.-1995- Т.11.- №5.- С.28.

9. Зубарева, Т.С. и др. Матричная металлопротеиназа мембранного типа 4 (MT4-ММП): роль и значение в патогенезе опухолевого роста // Медицинский Альянс.-2022- Т.10.- №2.- С.58-67.
10. Клишо, Е.В. Кондакова, И.В. Чойнзонов, Е.Л. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // Сибирский онкологический журнал.-2003- №2.- С.62-70.
11. Кудряшова, Т.В. и др. Кальдесмон изменяет структуру актина на лидирующем крае и подавляет миграцию клеток // Биофизика.- 2008- Т.53.- №6.- С.978-985.
12. Лесниченко, И.Ф. Грицаев, С.В. Капустин, С.И. Матриксные металлопротеиназы: характеристика, роль в лейкозогенезе и прогностическое значение // Вопросы онкологии.-2011- Т.57.- №3.- С.286-294.
13. Маринов, Д.Т. Маргарян, А.Г. Назлиев, П.Б. Роль тонкоигольных пункций в морфологической верификации и молекулярногенетическом тестировании рака легкого // Инновации и инвестиции.-2016- №11.
14. Мнихович, М.В. и др. Сигнальная система KISS1/KISS1R и ее роль в канцерогенезе // Гены и клетки.-2019- Т.14.- №3.
15. Пальцев, М.А. и др. Киссептины: молекулярные механизмы патологии дыхательной системы // Молекулярная медицина.-2022- Т.20.- №4.- С.3-8.
16. Пальцев, М.А. и др. Кальдесмон и опухолевый рост: перспективы оптимизации диагностики и таргетной терапии // Архив патологии.-2023- Т.85.-№2.- С.53-59.
17. Плаксин, С.А. Диагностика и лечение доброкачественных опухолей легких // Хирургия. Журнал им. НИ Пирогова.-2021- №6.- С.106-111.
18. Родичкина, В.Р. и др. Иммуногистохимическая верификация киссептинов и их рецептора в органах плода человека в период

- внутриутробного развития // Онтогенез.-2017- Т.48.- №3.- С.203-210.
19. Савостикова, М.В. Фурминская, Е.Ю. Цитологическая и иммуноцитохимическая диагностика опухолей легких // Вестник РОНЦ им. НН Блохина РАМН.-2015- Т.26.- №3.
20. Чиссов, В. и др. Злокачественные опухоли легких // Врач.-2006- №13.- С.12-18.
21. Шадрина, А.С. и др. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии // Альманах клинической медицины.-2017- Т.45.- №4.- С.266-279.
22. Эрдынеева, Д.Б. и др. Роль циклина d1 в механизмах резистентности к гормональной терапии тамоксифеном // Сибирский онкологический журнал.-2020- Т.19.- №4.- С.138-145.
23. Ярмолинская, М.И. Молотков, А.С. Денисова, В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // Журнал акушерства и женских болезней.-2012- Т.61.- №1.- С.113-125.
24. Albert Wang, C.L. Caldesmon and smooth-muscle regulation // Cell biochemistry and biophysics.-2001- V.35.- №3.- P.275-288.
25. Ali, S. et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer // Bioinformation.-2016- V.12.- №3.- P.135.
26. Bhalakiya, N. Haque, N. Patel, P. Kisspeptin: A Novel Regulator in Reproductive Physiology // International J. of Livestock Research.- 2019- V.9.- №7.- P.1-13.
27. Bodor, J.N. Bumber, Y. Borghaei, H. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC) // Cancer.-2020- V.126.- №2.- P.260-270.

28. Buccione, R. Orth, J.D. McNiven, M.A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles // *Nature reviews Molecular cell biology*.-2004- V.5.- N<sup>o</sup>8.- P.647-657.
29. Cervantes-Garduño, A. et al. MT4-MMP modulates the expression of miRNAs in breast cancer cells // *Archives of medical research*.-2018- V.49.- N<sup>o</sup>7.- P.471-478.
30. Chabottaux, V. et al. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) induces lung metastasis by alteration of primary breast tumour vascular architecture // *Journal of cellular and molecular medicine*.-2009- V.13.- N<sup>o</sup>9b.- P.4002-4013.
31. Chiang, C.M. et al. Role of kisspeptin on cell proliferation and steroidogenesis in luteal cells in vitro and in vivo // *Journal of the Chinese Medical Association*.-2021- V.84.- N<sup>o</sup>4.- P.389-399.
32. Chu, P.G. et al. Utility of CD10 in distinguishing between endometrial stromal sarcoma and uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical comparison of 34 cases // *Modern Pathology*.-2001- V.14.- N<sup>o</sup>5.- P.465-471.
33. Clemente, C. et al. MT4-MMP deficiency increases patrolling monocyte recruitment to early lesions and accelerates atherosclerosis // *Nature communications*.-2018- V.9.- N<sup>o</sup>1.- P.910.
34. Comin, C.E. et al. h-Caldesmon, a useful positive marker in the diagnosis of pleural malignant mesothelioma, epithelioid type // *The American journal of surgical pathology*.-2006- V.30.- N<sup>o</sup>4.- P.463-469.
35. Costabel, U. Crestani, B. Wells, A. Idiopathic pulmonary fibrosis: ERS Monograph. Series Titl ed. // *European Respiratory Society*.-2016.-.V. 71.
36. Curado, M.P. et al. Cancer incidence in five continents, Volume IX. Series Titl ed. // *IARC Press, International Agency for Research on Cancer*.-2007.

37. Dąbrowska, R. Kulikova, N. Gagola, M. Nonmuscle caldesmon: its distribution and involvement in various cellular processes // *Protoplasma*.-2004- V.224.- N<sub>o</sub>1.- P.1-13.
38. De Marchi, T. et al. Annexin-A1 and caldesmon are associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive recurrent breast cancer // *Oncotarget*.-2016- V.7.- N<sub>o</sub>3.- P.3098.
39. Dhar, D.K. et al. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma // *International Journal of Cancer*.-2004- V.111.- N<sub>o</sub>6.- P.868-872.
40. Dubey, A.K. Gupta, U. Jain, S Epidemiology of lung cancer and approaches for its prediction: a systematic review and analysis // *Chinese journal of cancer*.-2016- V.35.- N<sub>o</sub>1.- P.1-13.
41. Ekinçi, Ö. et al. Compared with elastin stains, h-caldesmon and desmin offer superior detection of vessel invasion in gastric, pancreatic, and colorectal adenocarcinomas // *International journal of surgical pathology*.-2018- V.26.- N<sub>o</sub>4.- P.318-326.
42. Fisher, C. Montgomery, E. Healy, V. Calponin and h-caldesmon expression in synovial sarcoma; the use of calponin in diagnosis // *Histopathology*.-2003- V.42.- N<sub>o</sub>6.- P.588-593.
43. Foidart, P. et al. Expression of MT4-MMP, EGFR, and RB in triple-negative breast cancer strongly sensitizes tumors to erlotinib and palbociclib combination therapy // *Clinical Cancer Research*.-2019- V.25.- N<sub>o</sub>6.- P.1838-1850.
44. Fu, H.L. et al. Shedding of discoidin domain receptor 1 by membrane-type matrix metalloproteinases // *Journal of Biological Chemistry*.-2013- V.288.- N<sub>o</sub>17.- P.12114-12129.
45. Glukhova, M.A. et al. Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression // *Proceedings of the National Academy of Sciences*.-1988- V.85.- N<sub>o</sub>24.- P.9542-9546.

46. Gottsch, M.L. Clifton, D.K. Steiner, R.A. From KISS1 to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature // *Peptides*.-2009- V.30.- N<sub>0</sub>1.- P.4-9.
47. Greenberg, M.J. et al. Modulation of actin mechanics by caldesmon and tropomyosin // *Cell motility and the cytoskeleton*.-2008- V.65.- N<sub>0</sub>2.- P.156-164.
48. Harter, C.J. Kavanagh, G.S. Smith, J.T. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism // *Journal of Endocrinology*.-2018- V.238.- N<sub>0</sub>3.- P.R173-R183.
49. Hayashi, K. et al. Structural and functional relationships between h-and l-caldesmons // *Journal of Biological Chemistry*.-1991- V.266.- N<sub>0</sub>1.- P.355-361.
50. He, L. et al. A regulation loop between YAP and NR4A1 balances cell proliferation and apoptosis // *Cell Reports*.-2020- V.33.- N<sub>0</sub>3.- P.108284.
51. Helfman, D.M. et al. Caldesmon inhibits nonmuscle cell contractility and interferes with the formation of focal adhesions // *Molecular Biology of the Cell*.-1999- V.10.- N<sub>0</sub>10.- P.3097-3112.
52. Hieronimus, B. et al. Expression and characterization of membrane-type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP) and its different forms in melanoma // *Cellular Physiology and Biochemistry*.-2017- V.42.- N<sub>0</sub>1.- P.198-210.
53. Hirsch, F.R. et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments // *The Lancet*.-2017- V.389.- N<sub>0</sub>10066.- P.299-311.
54. Hou, Q. et al. Identification and functional validation of caldesmon as a potential gastric cancer metastasis-associated protein // *Journal of proteome research*.-2013- V.12.- N<sub>0</sub>2.- P.980-990.
55. Hu, K.L. et al. Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation // *Human reproduction update*.-2018- V.25.- N<sub>0</sub>3.- P.326-343.

56. Ikeguchi, M. Yamaguchi, K. Kaibara, N. Clinical Significance of the Loss of KiSS-1 and orphan G-Protein–Coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma // *Clinical Cancer Research*.-2004- V.10.- N<sub>4</sub>.- P.1379-1383.
57. Ishikawa, R. Yamashiro, S. Matsumura, F. Annealing of gelsolin-severed actin fragments by tropomyosin in the presence of Ca<sup>2+</sup>: potentiation of the annealing process by caldesmon // *Journal of Biological Chemistry*.-1989- V.264.- N<sub>28</sub>.- P.16764-16770.
58. Itoh, Y. et al. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase // *Journal of Biological Chemistry*.-1999- V.274.- N<sub>48</sub>.- P.34260-34266.
59. Iwata, K. Kunimura, Y. Ozawa, H. Hypothalamic kisspeptin expression in hyperandrogenic female rats and aging rats // *Acta Histochemica et Cytochemica*.-2019- P.19013.
60. Karampitsakos, T. et al. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis // *Pulmonary pharmacology & therapeutics*.-2017- V.45.- P.1-10.
61. Kim, C.W. et al. Overexpression of KiSS1 Induces the Proliferation of Hepatocarcinoma and Increases Metastatic Potential by Increasing Migratory Ability and Angiogenic Capacity // *Molecules and Cells*.-2022- V.45.- N<sub>12</sub>.- P.935.
62. Kim, K.H. et al. Up-regulated expression of l-caldesmon associated with malignancy of colorectal cancer // *BMC cancer*.-2012- V.12.- N<sub>1</sub>.- P.1-10.
63. Koganehira, Y. et al. Reduced expression of actin-binding proteins, h-caldesmon and calponin h1, in the vascular smooth muscle inside melanoma lesions: an adverse prognostic factor for malignant melanoma // *British Journal of Dermatology*.-2003- V.148.- N<sub>5</sub>.- P.971-980.



64. Köhler, C.N. The actin-binding protein caldesmon is in spleen and lymph nodes predominately expressed by smooth-muscle cells, reticular cells, and follicular dendritic cells // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*.-2010- V.58.- N<sub>o</sub>2.- P.183-193.
65. Kokate, S.B. et al. Caldesmon controls stress fiber force-balance through dynamic cross-linking of myosin II and actin-tropomyosin filaments // *Nature Communications*.-2022- V.13.- N<sub>o</sub>1.- P.1-20.
66. Lauer-Fields, J.L. Juska, D. Fields, G.B. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism // *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*.-2002- V.66.- N<sub>o</sub>1.- P.19-32.
67. Lederer, D.J. Martinez, F.J. Idiopathic pulmonary fibrosis // *New England Journal of Medicine*.-2018- V.378.- N<sub>o</sub>19.- P.1811-1823.
68. Lee, J.H. et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*.-1996- V.88.- N<sub>o</sub>23.- P.1731-1737.
69. Lei, Z. et al. Kisspeptin-13 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis through GPR54 in mice // *Molecular Medicine Reports*.-2019- V.20.- N<sub>o</sub>2.- P.1049-1056.
70. Li, H. et al. miR-21 promotes growth, invasion and migration of lung cancer cells by AKT/P-AKT/cleaved-caspase 3/MMP-2/MMP-9 signaling pathway // *International journal of clinical experimental pathology*.-2020- V.13.- N<sub>o</sub>4.- P.692.
71. Malhotra, J. et al. Risk factors for lung cancer worldwide // *European Respiratory Journal*.-2016- V.48.- N<sub>o</sub>3.- P.889-902.
72. Martin, T.A. Watkins, G. Jiang, W, G. KiSS-1 expression in human breast cancer // *Clinical experimental metastasis*.-2005- V.22.- P.503-511.
73. Matsumura, F. et al. Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells // *The Journal of cell biology*.-1998- V.140.- N<sub>o</sub>1.- P.119-129.

74. Mayanagi, T. Sobue, K. Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility // Cell adhesion & migration.-2011- V.5.- No2.- P.150-159.
75. Mirzapoiiazova, T. et al. The role of caldesmon in the regulation of endothelial cytoskeleton and migration // Journal of cellular physiology.-2005- V.203.- No3.- P.520-528.
76. Niland, S. Riscanevo, A.X. Eble, J.A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression // International journal of molecular sciences.-2021- V.23.- No1.- P.146.
77. Nimri, L. et al. Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth, membrane-type-4 metalloproteinase expression and metastasis-associated activities in colon cancer cells // Molecular carcinogenesis.-2013- V.52.- No11.- P.859-870.
78. Nishimura, K. et al. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming // Journal of Biological Chemistry.-2011- V.286.- No6.- P.4760-4771.
79. Nucci, M.R. et al. h-Caldesmon expression effectively distinguishes endometrial stromal tumors from uterine smooth muscle tumors // The American journal of surgical pathology.-2001- V.25.- No4.- P.455-463.
80. Organization, World Health International agency for research on cancer //.-2019.
81. Ou, Y-X. Bi, R. Meta-analysis on the relationship between the SNP of MMP-2-1306 C> T and susceptibility to breast cancer // European Review for Medical Pharmacological Sciences.-2020- V.24.- No3.
82. Owada, M. Koji Occurrence of caldesmon (a calmodulin-binding protein) in cultured cells: comparison of normal and transformed cells // Proceedings of the National Academy of Sciences.-1984- V.81.- No10.- P. 3133-3137.

83. Paye, A. et al. EGFR activation and signaling in cancer cells are enhanced by the membrane-bound metalloprotease MT4-MMP // *Cancer research*.-2014- V.74.- N<sub>23</sub>.- P.6758-6770.
84. Platonov, M.E. et al. KISS1 tumor suppressor restricts angiogenesis of breast cancer brain metastases and sensitizes them to oncolytic virotherapy in vitro // *Cancer Letters*.-2018- V.417.- P.75-88.
85. Radunovic, M. et al. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer // *BUON*.-2016- V.21.- N<sub>3</sub>.- P.597-602.
86. Ries, C. et al. Identification of a novel 82 kDa proMMP-9 species associated with the surface of leukaemic cells:(auto-) catalytic activation and resistance to inhibition by TIMP-1 // *Biochemical journal*.-2007- V.405.- N<sub>3</sub>.- P.547-558.
87. Ringel, M.D. et al. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells // *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*.-2002- V.87.- N<sub>5</sub>.- P.2399-2402.
88. Rizzello, A. et al. A proteomic analysis of human uterine myoma // *Current Protein and Peptide Science*.-2017- V.18.- N<sub>2</sub>.- P.167-174.
89. Rodgers, U.R. et al. Expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-28 // *Matrix Biology*.-2009- V.28.- N<sub>5</sub>.- P.263-272.
90. Rønnekleiv, O.K. Qiu, J. Kelly, M.J. Arcuate kisspeptin neurons coordinate reproductive activities with metabolism // *Seminars in reproductive medicine*. Thieme Medical Publishers -Year.-P.131-140.
91. Rush, D.S. et al. h-Caldesmon, a novel smooth muscle-specific antibody, distinguishes between cellular leiomyoma and endometrial stromal sarcoma // *The American journal of surgical pathology*.-2001- V.25.- N<sub>2</sub>.- P.253-258.

92. Sato, K. et al. Potent Vasoconstrictor Kisspeptin-10 Induces Atherosclerotic Plaque Progression and Instability: Reversal by its Receptor GPR 54 Antagonist // Journal of the American Heart Association.-2017- V.6.- No4.- P.e005790.
93. Schabath, M.B. Cote, M.L. Cancer progress and priorities: lung cancer // Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.-2019- V.28.- No10.- P.1563-1579.
94. Schwappacher, R. et al. cGMP-dependent protein kinase I $\beta$  regulates breast cancer cell migration and invasion via interaction with the actin/myosin-associated protein caldesmon // Journal of cell science.-2013- V.126.- No7.- P.1626-1636.
95. Shengbing, Z. et al. Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma // The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy.-2009- V.292.- No8.- P.1128-1134.
96. Sobue, K. et al. Control of actin-myosin interaction of gizzard smooth muscle by calmodulin-and caldesmonlinked flip-flop mechanism // Biomedical Research.-1982- V.3.- No2.- P.188-196.
97. Spiering, D. Hodgson, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility // Cell adhesion & migration.-2011- V.5.- No2.- P.170-180.
98. Tanaka, M. et al. Isolation of a mouse MT2-MMP gene from a lung cDNA library and identification of its product // FEBS letters.-1997- V.402.- No2-3.- P.219-222.
99. Thai, A. A. et al. Lung cancer // Lancet.-2021- V.398.- No10299.- P.535-554.
100. Travis, W.D. et al. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart // Journal of Thoracic Oncology.-2015- V.10.- No9.- P.1240-1242.

101. Ueki, N. et al. Expression of high and low molecular weight caldesmons during phenotypic modulation of smooth muscle cells // Proceedings of the National Academy of Sciences.-1987- V.84.- No24.- P.9049-9053.
102. Valiathan, R.R. et al. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression // Cancer.-2012- V.31.- P.295-321.
103. Vidarsdottir, H. et al. Immunohistochemical profiles in primary lung cancers and epithelial pulmonary metastases // Human pathology.- 2019- V.84.- P.221-230.
104. Villalobos, P. Wistuba, I.I. Lung cancer biomarkers // Hematology/Oncology Clinics.-2017- V.31.- No1.- P.13-29.
105. Wang, Y. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and-25 in gastric cancer // Oncology letters.- 2015- V.9.- No2.- P.671-676.
106. Yamakita, Y. et al. Caldesmon inhibits Arp2/3-mediated actin nucleation // Journal of Biological Chemistry.-2003- V.278.- No20.- P.17937-17944.
107. Yao, Y.B. et al. Caldesmon: Biochemical and Clinical Implications in Cancer // Frontiers in Cell and Developmental Biology.-2021- V.9.- P.634759.
108. Yates, A.D. et al. Ensembl 2020 // Nucleic acids research.-2020- V.48.- No1.- P.682-688.
109. Yip, C. et al. MT4-MMP: The GPI-anchored membrane-type matrix metalloprotease with multiple functions in diseases // International journal of molecular sciences.-2019- V.20.- No2.- P.354.
110. Yokouchi, K. et al.  $\alpha$ -Caldesmon regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and inhibits neointimal formation after angioplasty // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.-2006- V.26.- No10.- P.2231-2237.

111. Yoshio, T. et al. Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation // *FEBS letters*.-2007- V.581.- No20.- P.3777-3782.
112. Yoshio, T. et al. MRTF-A/B suppress the oncogenic properties of v-ras-and v-src-mediated transformants // *Carcinogenesis*.-2010- V.31.- No7.- P.1185-1193.
113. Yu, G. Qu, G. High molecular weight caldesmon expression in ovarian adult granulosa cell tumour and fibrothecoma // *Histopathology*.-2018- V.72.- No2.- P.359-361.
114. Yu, G. et al. Expression and clinical significance of H-caldesmon in gastrointestinal stromal tumor: is it a specific marker for myogenic differentiation? // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*.-2019- V.12.- No7.- P.2566.
115. Zhang, J. et al. Role of translational and rotational accelerations on brain strain in lateral head impact // *Biomed Sci Instrum*.-2006- V.42.- P.501-506.
116. Zhang, L. et al. Upregulation of cytoskeleton protein and extracellular matrix protein induced by stromal-derived nitric oxide promotes lung cancer invasion and metastasis // *Current molecular medicine*.-2014- V.14.- No6.- P.762-771.
117. Zhang, X. et al. Functional examination of novel kisspeptin phosphinic peptides // *PLoS One*.-2018- V.13.- No4.- P.e0195089.
118. Zhao, W. et al. IFITM1, CD10, SMA, and h-caldesmon as a helpful combination in differential diagnosis between endometrial stromal tumor and cellular leiomyoma // *BMC cancer*.-2021- V.21.- No1.- P.1-9.
119. Zheng, P.P. et al. Low-molecular weight caldesmon as a potential serum marker for glioma // *Clinical cancer research*.-2005- V.11.- No12.- P.4388-4392.

120. Zheng, S. et al. Expression of KISS1 and MMP-9 in non-small cell lung cancer and their relations to metastasis and survival // *Anticancer research*.-2010- V.30.- No3.- P.713-718.
121. Zieliński, M. Sitek, P. Ziora, D. Idiopathic pulmonary fibrosis coexisting with lung cancer—a review // *Advances in Respiratory Medicine*.-2018- V.86.- No6.- P.319-326.
122. Zítka, O. et al. Matrix metalloproteinases // *Current medicinal chemistry*.-2010- V.17.- No31.- P.3751-3768.