



ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА – β ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

А. И. Тарасенко¹, А. Н. Россоловский^{2✉}, О. Л. Березинец², А. Б. Бучарская², С. С. Пахомий², А. О. Ефимова³, Г. Н. Маслякова²

1. Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация

2. Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского, г. Саратов, Российская Федерация

3. Центральный клинический госпиталь ФТС России, г. Москва, Российская Федерация

✉ rossol@list.ru

Резюме

Цель исследования. Изучение степени экспрессии тканевых и сывороточных маркеров онкогенеза и нефрофиброза трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) и матриксного металлопротеиназа-9 (MMP-9) у больных, оперированных по поводу различных стадий ПКР.

Материалы и методы. В исследование включены данные клинических исследований 60 больных раком почки с T1–3N0M0, получивших хирургическое лечение в клинике урологии КБ им. С. Р. Миротворцева СГМУ с 2016 по 2019 гг. Пациенты разделены на 3 группы: 1-я группа – 20 пациентов, подвергнутых лапароскопической резекции почки; 2-я группа – 20 пациентов, которым была выполнена лапароскопическая нефрэктомия; 3-я группа – 20 больных, которым была выполнена открытая нефрэктомия. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых добровольцев, не имеющих хронического заболевания почек. У всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Всем пациентам на дооперационном этапе, в раннем (7–10-е сутки) и отдаленном послеоперационных периодах (через 1 и 2 года) методом твердофазного ИФА, на анализаторе StatFax 4200 с использованием наборов реактивов eBiosense и Cloud-Clone Corp. произведено исследование концентрации в сыворотке крови маркеров онкогенеза MMP-9 и TGF- β 1.

Результаты. Во всех группах больных ПКР выявлено исходное повышение концентрации MMP-9 по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). По результатам проведенного ROC анализа данный показатель обладает высокой специфичностью и чувствительностью в отношении прогнозирования ПКР на дооперационном этапе. Чувствительность и специфичность MMP-9 составили соответственно 87,5 % и 62 %, а диагностически значимый уровень MMP-9 при этом составил 958 нг/мл. Проведенный комплексный анализ содержания маркеров онкогенеза MMP-9 и TGF- β 1 в сыворотке крови и клетках опухоли выявил взаимосвязь данных показателей в различных биологических объектах.

Заключение. Маркеры онкогенеза и нефрофиброза TGF- β 1 и MMP-9 обеспечивают возможность неинвазивного мониторинга опухолевой прогрессии и вероятности метастазирования в условиях клиники. Сывороточные MMP-9 являются достоверным предиктором опухолевого роста. Концентрация TGF- β 1 в сыворотке крови не является достаточно достоверным маркером опухолевой прогрессии.

Ключевые слова:

почечно-клеточный рак, MMP-9, резекция почки, биомаркеры, маркеры почечной функции

Для корреспонденции:

Россоловский Антон Николаевич – д.м.н., заместитель директора, доцент кафедры урологии НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Российская Федерация.

Адрес: 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

E-mail: rossol@list.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9810-4363>

SPIN: 4622-7095, AuthorID: 665930

ResearcherID: AAD-4866-2021

Scopus Author ID: 57203353149

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания Минздрава России по теме НИР «Разработка алгоритмов применения молекулярно-генетических маркеров опухолевого микроокружения в клинической практике для прогнозирования распространенности и развития осложнений при лечении больных с первично-множественными злокачественными новообразованиями с поражением мочеполовых органов» (№ 121032600197-2).

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Тарасенко А. И., Россоловский А. Н., Березинец О. Л., Бучарская А. Б., Пахомий С. С., Ефимова А. О., Маслякова Г. Н. Прогностическое значение матриксных металлопротеиназ и трансформирующего фактора роста – β при раке почки. Исследования и практика в медицине. 2022; 9(2): 96–106. <https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-2-8>

Статья поступила в редакцию 21.03.2022; одобрена после рецензирования 27.04.2022; принята к публикации 07.06.2022.

© Тарасенко А. И., Россоловский А. Н., Березинец О. Л., Бучарская А. Б., Пахомий С. С., Ефимова А. О., Маслякова Г. Н., 2022

PROGNOSTIC VALUE OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR – β IN KIDNEY CANCER

A. I. Tarasenko¹, A. N. Rossolovskiy^{2✉}, O. L. Berezinets², A. B. Bucharskaya², S. S. Pakhomiy²,
A. O. Efimova³, G. N. Maslyakova²

1. I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

2. Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation

3. Central Clinical Hospital of the Federal Customs Service of Russia, Moscow, Russian Federation

✉ rossol@list.ru

Abstract

Purpose of the study. The study's objective is to investigate the expression level of tissue and serum markers of oncogenesis and nephrofibrosis transforming growth factor beta (TGF- β) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in patients operated for various stages of renal cell carcinoma.

Materials and methods. The study prospectively included medical data of 60 patients with kidney cancer with T1–3N0M0 who received surgical treatment in the Clinic of Urology named after S. R. Mirotvortsev of the State Medical University from 2016 to 2019. The patients were divided into 3 groups: Group 1 included 20 patients who underwent laparoscopic kidney resection; Group 2–20 patients who underwent laparoscopic nephrectomy; Group 3–20 patients who underwent open nephrectomy. The control group consisted of 15 healthy volunteers without chronic kidney diseases. All patients signed an informed consent to participate in the study. All patients at the preoperative stage, in the early (7–10 days) and remote postoperative periods (after 1 and 2 years) were tested by solid-phase ELISA on a StatFax 4200 analyzer using eBioscience and Cloud-Clone Corp reagent kits for the serum concentration of oncogenesis markers MMP-9 and TGF- β 1.

Results. Initial increase of MMP-9 concentration was detected in all groups of PCC patients compared to the control group ($p \leq 0.05$). According to the results of ROC analysis, this indicator has high specificity and sensitivity for prognosis of preoperative stage of renal cell carcinoma. The sensitivity and specificity of MMP-9 were 87.5 % and 62 %, respectively, and the diagnostically significant level of MMP-9 was 958 ng/ml. A comprehensive analysis of the content of MMP-9 and TGF- β 1 oncogenesis markers in serum and tumor cells revealed the correlation of these indicators in various biological objects.

Conclusion. Markers of oncogenesis and nephrofibrosis TGF- β 1 and MMP-9 provide an opportunity for non-invasive monitoring of tumor progression and probability of metastasis in the clinical setting. Serum MMP-9 are a reliable predictor of tumor growth. Serum TGF- β 1 concentration isn't a sufficiently reliable marker of tumor progression.

Keywords:

renal cell carcinoma, MMP-9, kidney resection, biomarkers, markers of renal function

For correspondence:

Anton N. Rossolovskiy – Dr. Sci. (Med.), deputy director, associate professor of the department of urology of the Research Institute of Fundamental and Clinical Urology Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation.

Address: 8/2 Trubetskaya str., Moscow 119991, Russian Federation

E-mail: rossol@list.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9810-4363>

SPIN: 4622-7095, AuthorID: 665930

ResearcherID: AAD-4866-2021

Scopus Author ID: 57203353149

Funding: the study was financially supported within the framework of the state task of the Ministry of Health of Russia on the topic of research "Development of algorithms for the use of molecular genetic markers of the tumor microenvironment in clinical practice to predict the prevalence and development of complications in the treatment of patients with primary multiple malignant neoplasms with lesions of the genitourinary organs" (No 121032600197-2).

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Tarasenko A. I., Rossolovskiy A. N., Berezinets O. L., Bucharskaya A. B., Pakhomiy S. S., Efimova A. O., Maslyakova G. N. Prognostic value of matrix metalloproteinases and transforming growth factor – β in kidney cancer. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2022; 9(2): 96–106. (In Russ.).
<https://doi.org/10.17709/2410-1893-2022-9-2-8>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных направлений развития современной биомедицины является поиск универсальных биомаркеров, позволяющих создать основу объективного подхода, в частности, при формировании хирургической стратегии лечения почечно-клеточного рака (ПКР) и определить оптимальный баланс между онкологической безопасностью и максимальным сохранением массы функционирующих нефронов.

Многочисленными исследованиями последних лет определены основные прогностические факторы, достоверно влияющие на показатели выживаемости больных ПКР. В настоящее время общепризнанными критериями прогноза являются соматический статус пациента по шкале Карновского, гистологический тип опухоли, стадия заболевания [1]. Однако использование существующих факторов не всегда обеспечивает возможность точного предсказания течения ПКР у конкретного пациента. Практически отсутствуют исследования количественных и качественных изменений различных клеток (макрофагов, тучных клеток, нейтрофилов), инфильтрирующих опухоль, экспрессии в них матриксных металлопротеиназ, во взаимосвязи с важнейшими клинико-морфологическими факторами почечно-клеточного рака, которые могут оказывать влияние на дальнейший прогноз заболевания [2].

Среди маркеров опухолевой прогрессии и нефрофиброза с наиболее изученными эффектами, в настоящее время можно выделить трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (Transforming growth factor beta – TGF- $\beta 1$) и матриксные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases – MMP-9). TGF- $\beta 1$ представляет собой плейотропный цитокин, который участвует в широком спектре биологических функций [3]. TGF- $\beta 1$ ассоциируется, как правило, с развитием почечного фиброза, как исхода многочисленных прогрессирующих заболеваний почек, играя важную роль в регуляции синтеза белков матрикса, ингибируя деградацию матрикса и изменяя межклеточное взаимодействие [4]. Кроме того, следует отметить, что цитокин TGF- $\beta 1$ принимает участие в создании толерогенной среды в организме хозяина с помощью уклонения от иммунитета опухоли при многих типах рака. TGF- $\beta 1$ способствует размножению и накоплению популяций иммуносупрессивных регуляторных клеток в микроокружении опухоли и является ключевым регулятором опухолевого метаболизма [5].

Многочисленные исследования показали, что деградация внеклеточного матрикса, вызванная определенными ферментами, имеет ключевое значение в метастазировании опухоли. Семейство матриксных металлопротеиназ играет решающую роль в развитии опухолевой прогрессии, в том числе и ангиогенезе

новообразования [6]. MMP-9 является наиболее важным компонентом ремоделирования опухолевой ткани, способной катализировать типы V, VII, IX, X и IV коллагена, эластин, фибрин, фибриноген и плазминоген, способствуя инвазии и метастазированию злокачественных клеток [7].

Имеются данные о том, что ингибирование металлопротеиназ ослабляет инвазию опухолевых клеток, что позволяет рассматривать MMP-9 как в качестве потенциального маркера рака, так и терапевтической мишени [8]. Кроме того, было замечено, что MMP-9 вносит вклад в патогенез почечного фиброза за счет рекрутирования макрофагов и расщепления остеопонтина. Существует также положительная корреляция между экскрецией с мочой MMP-9 и TGF- β , что подтверждает его профибротическое действие [9]. Учитывая вышеуказанные данные, повышенная экспрессия MMP-9 теоретически должна коррелировать с плохим прогнозом и высокой стадией опухоли. Тем не менее, несколько исследований показали, что высокая экспрессия MMP-9 не коррелировала с неблагоприятными клинико-морфологическими особенностями или плохим прогнозом, особенно при оценке MMP-9 в сыворотке крови пациента, что может быть обусловлено небольшим размером выборки в отдельных исследованиях [6].

Таким образом, определение концентрации биомаркеров TGF- β и MMP-9 в различных биологических средах может существенно различаться, что требует дальнейшего изучения данных показателей для их использования в прогнозировании течения ПКР.

Цель исследования: изучение степени экспрессии тканевых и сывороточных маркеров онкогенеза и нефрофиброза TGF- β и MMP-9 у больных, оперированных по поводу различных стадий ПКР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало данные клинических исследований 60 больных раком почки с T1–3N0M0, получивших хирургическое лечение в клинике урологии КБ им. С. П. Миротворцева СГМУ с 2016 по 2019 гг. При этом 20 (33,3 %) пациентам основной группы выполнялось органосохраняющее вмешательство – лапароскопическая резекция почки, 20 (33,3 %) больным – лапароскопическая нефрэктомия, остальным 20 (33,3 %) больным – открытая нефрэктомия. Группу контроля составили 15 практически здоровых добровольцев, не имеющих хронического заболевания почек.

С помощью нефрометрических шкал PADUA и RENAL определяли техническую сложность органосохраняющих вмешательств и прогнозировали возможность послеоперационных осложнений. При этом у 20 (33,3 %) пациентов, локализация и разме-

ры опухоли по шкале PADUA – 4–6 баллов, по шкале RENAL – 4–9 баллов по нефрометрическому индексу. У 40 пациентов (66,6 %) опухоли почек – 4–8 баллов по шкале PADUA, 6–11 баллов нефрометрического индекса по шкале RENAL. Средний возраст 60 больных, вошедших в исследование, составил 57,8 (41–77) лет. Соотношение мужчин и женщин составило 1,2:1. В ходе обследования пациентов диагностированы опухоли почечной паренхимы (справа – 37 (61,6 %), слева – 23 (38,4 %)).

У пациентов, которым выполняли резекцию почки, преобладали новообразования среднего сегмента (34 (56,7 %)), опухоли верхнего полюса составили 23,3 % (14 пациентов) и нижнего полюсов почки в 20 % (12 пациентов) наблюдений. Большая часть опухолей выходила за полюсную линию (12 (60 %)), в том числе более чем на 50 % (5 (25 %)). Средняя величина диаметра опухолевых очагов составила 3,41 (2,0–5,2) см. Стадия T1a диагностирована у 14 (70 %), T1b – у 6 (30 %) пациентов. Отдаленные и регионарные метастазы не выявлены.

У пациентов подвергшихся нефрэктомии также преобладали новообразования среднего сегмента (48 (80 %)), опухоли верхнего полюса наблюдались у 13,3 % (8 пациентов), нижнего полюса почки у 6,7 % (4 пациента) наблюдений. У пациентов, которым выполняли нефрэктомию, большинство опухолей располагалось интрапаренхиматозно, в непосредственной близости от магистральных сосудов. Средняя величина диаметра опухолевых очагов составила 4,64 (от 3,0 – до 7,7) см. Категория больных со стадией T1 составила 41 (68,2 %) человек, с T2 стадией – 11 (18,2 %), стадия T3 диагностирована у 8 (13,6 %) пациентов. Отдаленные и регионарные метастазы не выявлены.

Всем пациентам на дооперационном этапе, в раннем (7–10-е сутки) и отдаленном послеоперационных периодах (через 1 и 2 года) методом твердофазного ИФА, на анализаторе StatFax 4200 с использованием наборов реактивов eBiosence и Cloud-Clone Corp. произведено исследование концентрации в сыворотке крови маркеров онкогенеза MMP-9 и TGF- β 1.

Всем пациентам выполнялось морфологическое исследование операционного материала на макроскопическом и микроскопическом уровнях. При макроскопическом исследовании оценивали внешний вид опухоли и вид на разрезе, определяли ее объем, наличие инвазивного роста в лоханку и паранефральную клетчатку, наличие вторичных изменений (некрозов, кровоизлияний). Для микроскопического исследования забирали фрагменты опухоли (не менее 3-х) и условно неизменной ткани почки и фиксировали 10 % забуференным формалином. После стандартной гистологической проводки в спиртах возрастающей

концентрации материал заливали парафином. К проведению обзорного морфологического исследования на ротаторном микротоме были подготовлены серийные срезы толщиной 5–7 мкм с окрашиванием гематоксилином и эозином. При гистологическом исследовании операционного материала определяли степень ядерной атипии по Фурману, наличие очагов воспаления, некрозов, кровоизлияний, инвазии опухоли в окружающие структуры.

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) операционного материала (16 случаев светло-клеточного рака почки со степенью ядерной атипии по Фурману G1–3) выполняли на парафиновых срезах с использованием безбиотинной системы детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System (Spring Bioscience, USA) с антителами Anti-MMP9 antibody (1:500, Abcam, UK) и Anti-TGF beta 1 antibody (1:500, Abcam, UK). Демаскировку клеточных антигенов, осуществляли путем нагревания срезов в микроволновой печи в специализированном буфере (Target retrieval solution, pH = 9,0).

Экспрессия маркеров MMP-9 и TGF- β 1 была представлена в виде диффузной или очаговой реакции с гомогенным окрашиванием мембран клеток и гранулярными включениями в цитоплазме коричневого цвета. В препаратах определяли интенсивность экспрессии маркеров MMP-9 и TGF- β 1 в опухолевых клетках с помощью полуколичественных критериев выраженности признака, где: «0» – признак отсутствует; «1» – слабо выраженный признак; «2» – умеренно выраженный признак; «3» – сильно выраженный признак и далее высчитывали процент клеток с разной степенью экспрессии. Результаты реакций оценивали системой гистосчета Histochemical score:
$$\text{Histochemical score} = \sum P(i) \times i$$

где, i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0–3; $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с различной степенью интенсивности.

Результат H счет трактовался следующим образом:

от 0 до 10 – отрицательный;

от 10 до 100 – слабopоложительный;

от 100 до 300 – положительный.

Морфометрическое исследование ИГХ препаратов выполняли в 10-ти полях зрения с использованием системы анализа цифровых изображений Микровизора медицинского μ Vizo-101 ЛОМО.

Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel и SPSS 13.0 for Windows. Нормальность распределения показателей в группах была проверена с использованием теста Колмогорова-Смирнова, равенство генеральных дисперсий определяли с помощью F-критерия Фишера. В случаях, когда распределение не соответствовало нормальному, для каждого пока-

зателя в исследуемых группах вычисляли медиану и квартили, оценку различия между выборками проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Исследование корреляционных взаимосвязей между признаками осуществляли при помощи метода Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе сывороточной концентрации MMP-9 выявлено ее исходное повышение в сыворотке крови на дооперационном этапе у большинства больных ПКР по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$) (рис. 1). С помощью проведенного ROC-анализа установлено,

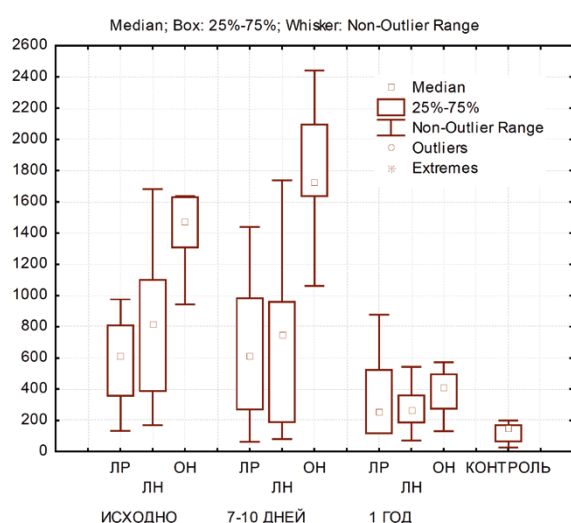


Рис. 1. Содержание MMP-9 в сыворотке крови больных ПКР после оперативного лечения.

Fig. 1. The content of MMP-9 in the blood serum of patients with RCC after surgical treatment.

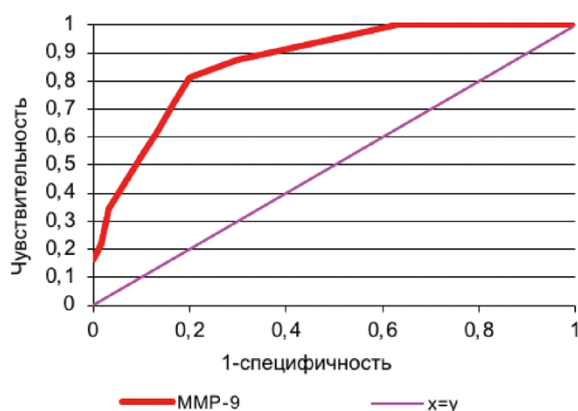


Рис. 3. ROC-анализ. Чувствительность и специфичность MMP-9 в сыворотке крови для прогнозирования прогрессирования ПКР.

Fig. 3. ROC analysis. Sensitivity and specificity of MMP-9 in blood serum for predicting the progression of RCC.

что данный показатель обладает высокой специфичностью и чувствительностью в отношении прогнозирования ПКР на дооперационном этапе (рис. 2).

Для MMP-9 чувствительность составила 96 %, специфичность – 85 %. Точкой отсечения (Cut-off value), соответствующей максимальным показателями чувствительности и специфичности, было 275 нг/мл (диагностически значимый уровень для прогнозирования ПКР на дооперационном этапе в качестве скрининга).

Следует отметить, что повышение уровня MMP-9 в сыворотке крови ассоциировалось с высокой градацией опухоли G₃ по Фурману и лимфоваскулярной инвазией, что также выявлялось в основном у больных с «открытой» нефрэктомией. Через 1 год после

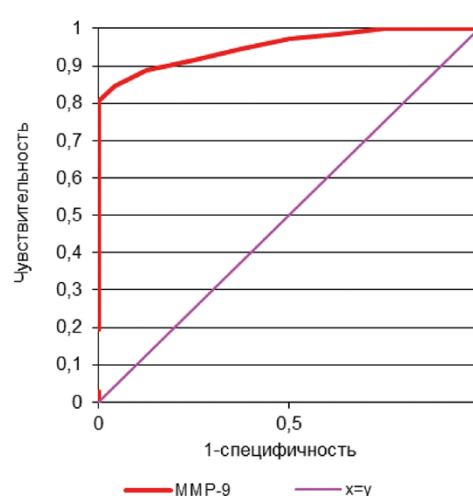


Рис. 2. ROC-анализ. Чувствительность и специфичность MMP-9 в сыворотке крови для прогнозирования ПКР на дооперационном этапе.

Fig. 2. ROC analysis. Sensitivity and specificity of MMP-9 in blood serum for predicting RCC at the preoperative stage.



Рис. 4. Содержание TGF- β 1 в сыворотке крови больных ПКР после оперативного лечения.

Fig. 4. The content of TGF- β 1 in the blood serum of patients with RCC after surgical treatment.

вмешательства происходит значительное снижение концентрации данного маркера у больных ПКР. При этом уровень MMP-9 также достоверно превышал контрольные значения ($p \leq 0,05$). При выявлении взаимосвязи MMP-9 с размером опухоли (Т) оказалось, что наиболее высокие его уровни наблюдали у больных со стадией Т3. Кроме того, значения данного маркера коррелировали со степенью дифференцировки опухоли по Fuhrman.

При проведении ROC-анализа для выявления прогрессирования опухоли чувствительность и специфичность MMP-9 составили соответственно 87,5 % и 62 %, а диагностически значимый уровень MMP-9 при этом составил 958 нг/мл.

Таким образом, сывороточная экспрессия MMP-9 является высокочувствительным и специфичным маркером в отношении прогнозирования прогрессирования ПКР, что подтверждается результатами ROC анализа (рис. 3).

Уровень TGF- β 1 в сыворотке крови у больных ПКР на дооперационном этапе был значительно повышен по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$) (рис. 4, табл. 1, 2).

Отсутствие значимого нарастания концентрации TGF- β 1 в сыворотке крови в послеоперационном периоде и через 1 год после вмешательства также

демонстрируют низкий риск дальнейшего прогрессирования опухолевого процесса и метастазирования у всех пациентов. При корреляционном анализе уровень TGF- β 1 в сыворотке крови продемонстрировал значимое нарастание данного показателя в зависимости от стадии опухолевого процесса, а также от степени дифференцировки опухоли по Фурману ($p \leq 0,001$). По данным проведенного ROC-анализа, чувствительность и специфичность TGF- β 1 в сыворотке крови в отношении прогнозирования дальнейшего течения ПКР составили соответственно 88 % и 83 % при его повышении более 49,1 пг/мл (рис. 5)

При морфологическом исследовании операционного материала светлоклеточного рака почки в 26-ти случаях (43,3 %) степень ядерной атипии по Фурману определялась на уровне G_1 , в 20-ти случаях (33,3 %) – на уровне G_2 , в 14 случаях (23,3 %) – на уровне G_3 . Наличие в ткани опухоли воспалительного клеточного инфильтрата, очагов некрозов и кровоизлияний не зависело от степени ядерной атипии и определялось в 8 % случаев. Повышение степени ядерной атипии по Фурману до G_3 сопровождалось увеличением количества случаев инвазивного роста опухоли в капсулу и окружающие структуры, а также увеличением объема опухоли. При ядерной атипии

Таблица 1. Уровни маркеров онкогенеза MMP-9 и TGF- β 1 у больных ПКР в зависимости от объема опухоли ($n = 60$)
Table 1. Levels of oncogenesis markers MMP-9 and TGF- β 1 in patients with RCC, depending on the volume of the tumor ($n = 60$)

Показатель / Indicator	MMP-9 (нг/мл) / MMP-9 (ng/ml)	TGF- β 1 (пг/мл) / TGF- β 1 (pg/ml)	Число больных ПКР / RCC patients number
Стадия Т1 / Stage T1	M = 808 (368–1628)	M = 56,5 (22–68)	41 (68,2 %)
Стадия Т2 / Stage T2	M = 821 (591–1174)	M = 58,6 (38–76)	11 (18,2 %)
Стадия Т3 / Stage T3	M = 1281 (906–1636)	M = 63,8 (42–209)	8 (13,6 %)
Контроль / Stage	M = 141 (24,7–198,6)	M = 8,7 (5,7–13,4)	15 (100 %)

Примечание: М – медиана значения, в скобках указаны верхний и нижний квартиль.
Note: M is the median of the value, the upper and lower quartile are indicated in parentheses.

Таблица 2. Уровни маркеров онкогенеза MMP-9 и TGF- β 1 в сыворотке крови у больных ПКР в зависимости от степени дифференцировки опухоли по Фурману ($n = 60$)
Table 2. Levels of oncogenesis markers MMP-9 and TGF- β 1 in blood serum in patients with RCC, depending on the degree of Furman tumor differentiation ($n = 60$)

Показатель / Indicator	MMP-9 (нг/мл) / MMP-9 (ng/ml)	TGF- β 1 (пг/мл) / TGF- β 1 (pg/ml)	Число больных ПКР / RCC patients number
G1	M = 1048 (386–1468)	M = 41 (22–76)	26 (43,3 %)
G2	M = 842 (582–982)	M = 63 (25–158)	20 (33,3 %)
G3	M = 1250 (808–1306)	M = 74,3 (34–209)	14 (23,3 %)
Контроль / Control	M = 141 (24,7–198,6)	M = 8,7 (5,7–13,4)	15 (100 %)

Примечание: М – медиана значения, в скобках указаны верхний и нижний квартиль.
Note: M is the median of the value, the upper and lower quartile are indicated in parentheses.

G₁ инвазия опухолевого роста в капсулу отмечалась в 58 % случаев, при G₂ – в 87,5 % случаев, при G₃ – в 100 %. Объем опухоли при ядерной атипии G₁ и G₂ достоверно не различался (медиана 32,1 мм³ и 11,1 мм³ соответственно). Максимальные размеры опухоли наблюдались при степени ядерной атипии по Фурману G₃ (медиана 416,6 мм³).

При иммуногистохимическом исследовании положительная реакция с маркерами MMP-9 и TGF- β 1 наблюдалась во всех случаях светлоклеточного рака почки и была представлена в виде диффузного цитоплазматического и мембранного окрашивания коричневого цвета разной степени интенсивности. Положительная экспрессия маркеров MMP-9 и TGF- β 1 была отмечена не только в опухолевых клетках, но и в эпителиальных клетках канальцев почки.

Результаты иммуногистохимического исследования и иммуноферментного анализа MMP-9 и TGF- β 1 в сыворотке крови на дооперационном этапе представлены в таблице 3.

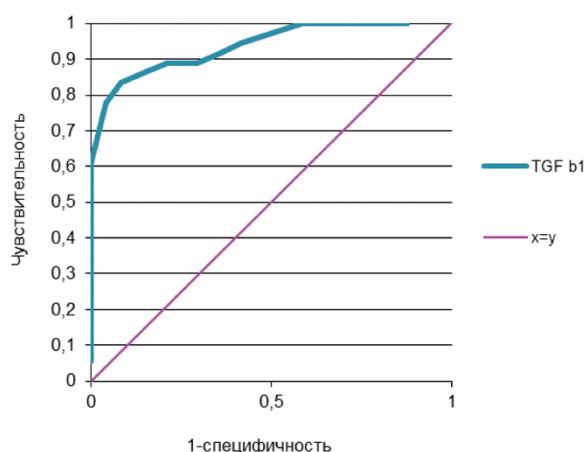


Рис. 5. ROC-анализ. Чувствительность и специфичность TGF- β 1 в сыворотке крови для прогнозирования ПКР.

Fig. 5. ROC analysis. Sensitivity and specificity of TGF- β 1 in blood serum for the prediction of RCC.

При анализе выраженности экспрессии маркера MMP-9 в опухолевых клетках установлено, что увеличение степени ядерной атипии по Фурману наблюдается при увеличении интенсивности экспрессии (рис. 6а, б, с).

Незначительная и умеренная степень экспрессии маркера отмечалась при степени ядерной атипии G₁–G₂ (медиана гистосчета составила 81 [0;226] и 83 [0;146] соответственно). Наибольшее значение опухолевых клеток экспрессирующих MMP-9 с выраженной интенсивностью окрашивания наблюдалось при степени ядерной атипии G₃ (медиана гистосчета составила 145 [0;294]).

При проведении корреляционного анализа установлена положительная зависимость между степенью экспрессии маркера MMP-9 и объемом опухоли: наибольшее число клеток, экспрессирующих MMP-9 с выраженной степенью окрашивания, было обнаружено при объеме опухоли свыше 400 мм³ ($r = 0,55$, $p = 0,0001$).

При сравнении результатов ИГХ экспрессии маркера онкогенеза MMP-9 (данные гистосчета) с показателями, полученными методом ИФА в сыворотке крови пациентов до оперативного вмешательства, установлено наличие положительной корреляционной зависимости между ними ($r = 0,26$, $p = 0,004$).

При исследовании концентрации маркера онкогенеза MMP-9 в сыворотке крови с другими морфологическими показателями также установлена положительная зависимость со степенью ядерной атипии по Фурману ($r = 0,41$, $p = 0,000$), объемом опухоли ($r = 0,91$, $p = 0,000$) и клинической стадией опухолевого процесса ($r = 0,34$, $p = 0,001$).

Мембранная и цитоплазматическая экспрессия маркера TGF- β 1 в опухолевых клетках варьировалась от незначительной до выраженной степени (рис. 6д, е, ф). Однако, при статистическом анализе достоверной зависимости между степенью экспрессии маркера TGF и степенью ядерной атипии по Фурману,

Таблица 3. Маркеры MMP-9 и TGF β в опухолевой ткани и сыворотке в зависимости от степени ядерной атипии и объема опухоли (n = 16)

Table 3. Markers of MMP-9 and TGF β in tumor tissue and serum, depending on the degree of nuclear atypia and tumor volume (n = 16)

Степень ядерной атипии по Фурману / The degree of nuclear atypia according to Furman	Объем опухоли, мм ³ / Tumor volume, mm ³	MMP-9 (гистосчет) / MMP-9 (histocount)	TGF (гистосчет) / TGF (histocount)	MMP-9 в сыворотке / serum MMP-9	TGF в сыворотке / serum TGF
G1	32,1 [29,7; 110,8]	81 [0; 226]	135,5 [0; 300]	368 [168; 1284]	45 [22,1; 75,4]
G2	11,1 [11,1; 121,7]	83 [0; 146]	100 [0; 300]	131,2 [131,2; 582]	60,3 [38,3; 83,8]
G3	416,6 [318,6; 1169,9]	145 [0; 294]	100 [0; 262]	1306 [1306; 1636]	76 [41; 102,2]

объемом опухоли и клинической стадией опухолевого процесса не обнаружено.

Анализ концентрации маркера TGF- β 1 в сыворотке крови пациентов до оперативного вмешательства показал положительную корреляционную зависи-

мость с объемом опухоли ($r = 0,36$, $p = 0,002$) и клинической стадией опухолевого процесса ($r = 0,49$, $p = 0,000$) и степенью ядерной атипии по Фурману ($r = -0,45$, $p = 0,000$).

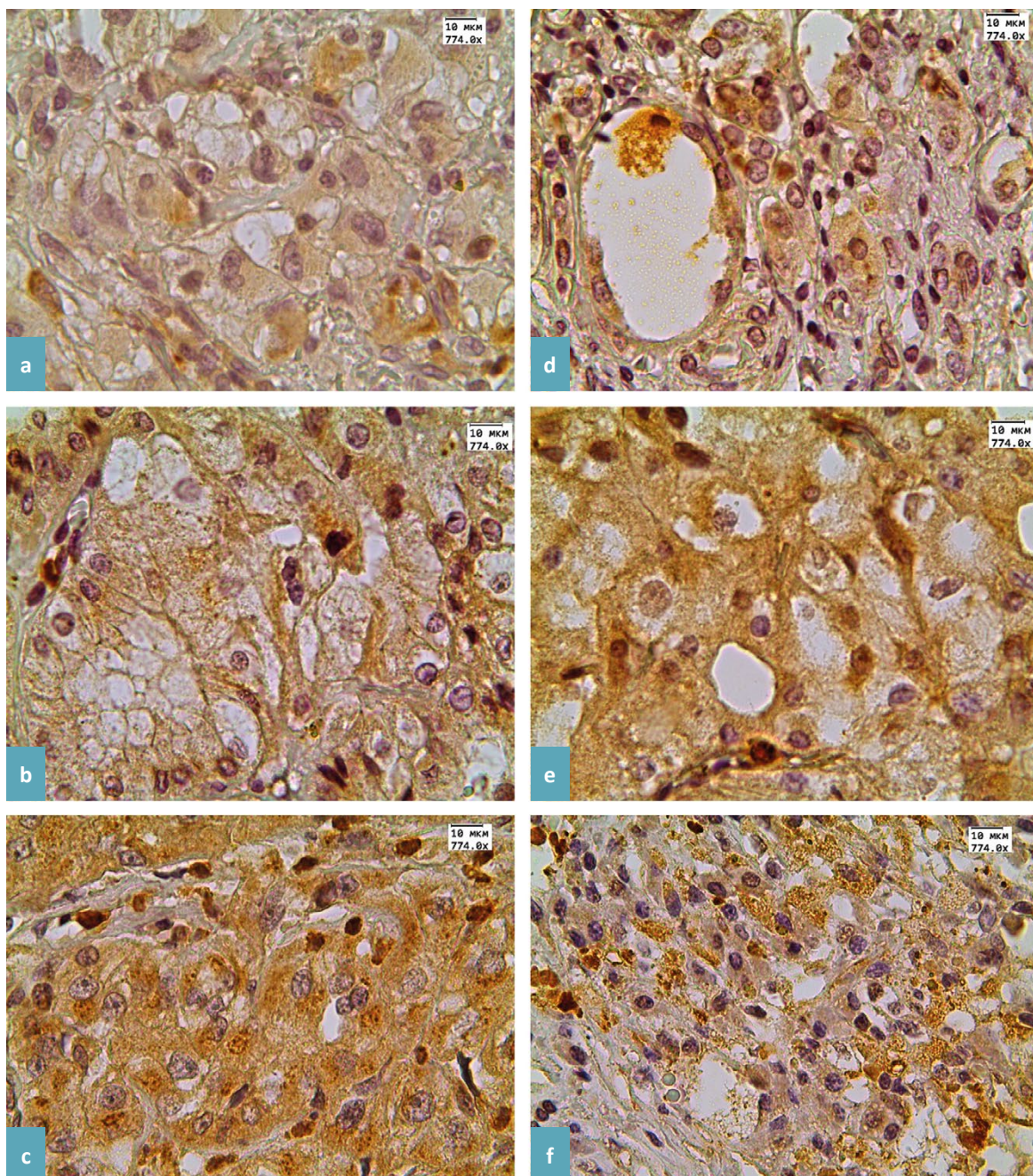


Рис. 6. Экспрессия маркера MMP-9 в клетках ПРК а) при степени ядерной атипии по Фурману G1, б) при степени ядерной атипии по Фурману G2, в) при степени ядерной атипии по Фурману G3. ($\times 774,0$) Экспрессия маркера TGF в клетках ПРК д) при степени ядерной атипии по Фурману G1, е) при степени ядерной атипии по Фурману G2, ф) при степени ядерной атипии по Фурману G3. ($\times 774,0$).

Fig. 6. Expression of the MMP-9 marker in the cells of PRK a) with the degree of nuclear atypia according to Furman G1, b) with the degree of nuclear atypia according to Furman G2, c) with the degree of nuclear atypia according to Furman G3. ($\times 774,0$) Expression of the TGF marker in the cells of PRK d) with the degree of nuclear atypia according to Furman G1, e) with the degree of nuclear atypia according to Furman G2, f) with the degree of nuclear atypia according to Furman G3. ($\times 774,0$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный комплексный анализ содержания маркеров онкогенеза MMP-9 и TGF- β 1 в сыворотке крови и клетках опухоли выявил взаимосвязь данных показателей в различных биологических объектах, и они могут быть использованы для определения прогноза течения ПКР. Так, уровни маркера онкогенеза MMP-9 в сыворотке крови на дооперационном этапе имели положительную зависимость со следующими клинико-морфологическими показателями: степенью ядерной атипии по Фурману, объемом опухоли и клинической стадией опухолевого процесса. Выявленные в исследовании изменения подтверждают доказательства того, что у MMP-9 имеется сильная корреляция между экспрессией гена, стадией опухоли и ее агрессивностью [10]. Также данные проведенного исследования могут иметь практически применимое значение в условиях урологических стационаров и повышение уровня маркера MMP-9 при ПКР свидетельствует о худшем прогнозе заболевания, включая сокращение времени выживаемости пациента [11]. Результаты проведенного исследования согласуются с данными Т. М. Черданцевой и соавт., (2018), которые с помощью компьютерного анализа иммуногистохимических изображений определяли интегральную оптическую плотность MMP-9 непосредственно в цитоплазме опухолевых клеток, что дало возможность получить объективные данные для каждого элемента злокачественного новообразования [12]. В указанной работе также проведены клинико-морфологические сопоставления, показавшие, что оптическая плотность MMP-9 непосредственно в цитоплазме опухолевых клеток взаимосвязана с рядом важных клинико-морфологических характеристик неоплазий и послеоперационной выживаемостью больных ПКР.

Показатели маркера TGF- β 1 в сыворотке крови пациентов до оперативного вмешательства также продемонстрировали положительную корреляционную зависимость с объемом опухоли и клинической стадией опухолевого процесса, и, несколько меньше, со степенью ядерной атипии по Фурману. С увеличением степени выраженности атипии по Фурману уровень TGF- β 1 в сыворотке крови пациентов возрастал. При этом известны разнонаправленные эффекты данного цитокина на стадиях развития

онкогенеза. Так, на ранних этапах формирования опухоли TGF- β 1 подавляет пролиферацию опухолевых клеток, выступая в качестве фактора супрессии опухолей [13]. На более поздних стадиях ПКР инактивация сигнального каскада TGF- β 1 исчезает, и раковые клетки становятся способными избежать этих ингибирующих эффектов. Происходит потеря ответа опухолевых клеток на TGF- β 1, что вызывает увеличение секреции этого фактора, способствуя пролиферации и инвазии клеток, и прогрессированию опухоли [14]. Следует отметить, что среди больных, вошедших в исследование, ни в одном случае не было выявлено отдаленных метастазов. Это в значительной степени может объяснять отсутствие значимого нарастания маркера TGF- β у исследуемых больных и четкой корреляционной связи с ядерной градацией по Фурману. Более того, следует отметить, что TGF- β 1 является известным профибротическим медиатором, концентрация которого коррелирует со степенью нефросклероза. В проведенной работе не было выявлено пациентов, имеющих стадии ХБП, превышающие СЗБ, исходно и в отдаленном послеоперационном периоде что также может влиять на концентрацию данного маркера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение степени экспрессии тканевых и сывороточных маркеров онкогенеза и нефрофиброза TGF- β 1 и MMP-9 у больных, оперированных по поводу различных стадий ПКР продемонстрировало их стойкую взаимосвязь, обеспечивающую возможность неинвазивного мониторинга опухолевой прогрессии и вероятности метастазирования в условиях клиники. Установлена значимая корреляция между степенью ядерной атипии по Фурману, объемом опухоли и клинической стадией опухолевого процесса, и концентрацией MMP-9. Таким образом доказана роль сывороточных MMP-9 как достоверного предиктора опухолевого роста.

В то же время роль TGF- β 1 на ранних стадиях ПКР может быть нивелирована его супрессорными эффектами, ингибирующими пролиферацию и рост опухоли, и его профибротическими свойствами, в связи с чем концентрация TGF- β 1 в сыворотке крови не является достаточно достоверным маркером опухолевой прогрессии.

Список источников

1. Евсюкова О. И., Матвеев В. Б. Рак почки: что нового в 2019 году. Онкоурология. 2019;15(4):120–125. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2019-15-4-120-125>
2. Казарцев А. В., Черданцева Т. М., Бобров И. П., Лазарев А. Ф., Климачев В. В. Интратуморальные стромальные тучные клетки при почечно-клеточном раке: клинико-морфологические сопоставления. Российский онкологический журнал. 2017;22(1):21–24. <https://doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-1-21-24>

3. Gómez-Gil V. Therapeutic Implications of TGF β in Cancer Treatment: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 20;13(3):379. <https://doi.org/10.3390/cancers13030379>
4. Isaka Y. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 27;19(9):2532. <https://doi.org/10.3390/ijms19092532>
5. Angioni R, Sánchez-Rodríguez R, Viola A, Molon B. TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 22;13(3):401. <https://doi.org/10.3390/cancers13030401>
6. Gong L, Wu D, Zou J, Chen J, Chen L, Chen Y, et al. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Apr 5;7(14):18458–18468. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7607>
7. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013 Jun;48(3):222–272. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>
8. Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, et al. PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- κ B/MMP-9 signaling pathway. *Mol Cancer*. 2015 Mar 26;14:66. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0332-2>
9. Bieniaś B, Sikora P. Selected Metal Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases as Potential Biomarkers for Tubulointerstitial Fibrosis in Children with Unilateral Hydronephrosis. *Dis Markers*. 2020;2020:9520309. <https://doi.org/10.1155/2020/9520309>
10. Wu D, Pan H, Zhou Y, Zhou J, Fan Y, Qu P. microRNA-133b downregulation and inhibition of cell proliferation, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase-9 in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2014 Jun;9(6):2491–2498. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2116>
11. Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001 Oct;7(10):3113–3119.
12. Черданцева Т. М., Бобров И. П., Варламов С. В., Мяделец М. Н., Климачев И. В., Авдалян А. М. и др. Прогностическое значение исследования матричной металлопротеиназы 9 при почечно-клеточном раке. *Онкоурология*. 2018;14(3):17–24. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2018-14-3-17-24>
13. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF- β and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019 Mar;41:702–710. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.033>
14. Gómez-Gil V. Therapeutic Implications of TGF β in Cancer Treatment: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 20;13(3):379. <https://doi.org/10.3390/cancers13030379>

References

1. Evsyukova OI, Matveev VB. Renal cell carcinoma: what's new in 2019. *Cancer Urology*. 2019;15(4):120-125. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2019-15-4-120-125>
2. Kazarcev AV, Cherdanceva TM, Bobrov IP, Lazarev AF, Klimachev VV. Intratumoral stromal mast cells in renal cell carcinoma: clinical and morphological comparisons. *Russian Journal of Oncology*. 2017;22(1):21–24. <https://doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-1-21-24>
3. Gómez-Gil V. Therapeutic Implications of TGF β in Cancer Treatment: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 20;13(3):379. <https://doi.org/10.3390/cancers13030379>
4. Isaka Y. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 27;19(9):2532. <https://doi.org/10.3390/ijms19092532>
5. Angioni R, Sánchez-Rodríguez R, Viola A, Molon B. TGF- β in Cancer: Metabolic Driver of the Tolerogenic Crosstalk in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 22;13(3):401. <https://doi.org/10.3390/cancers13030401>
6. Gong L, Wu D, Zou J, Chen J, Chen L, Chen Y, et al. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Apr 5;7(14):18458–18468. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7607>
7. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013 Jun;48(3):222–272. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>
8. Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, et al. PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- κ B/MMP-9 signaling pathway. *Mol Cancer*. 2015 Mar 26;14:66. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0332-2>
9. Bieniaś B, Sikora P. Selected Metal Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases as Potential Biomarkers for Tubulointerstitial Fibrosis in Children with Unilateral Hydronephrosis. *Dis Markers*. 2020;2020:9520309. <https://doi.org/10.1155/2020/9520309>
10. Wu D, Pan H, Zhou Y, Zhou J, Fan Y, Qu P. microRNA-133b downregulation and inhibition of cell proliferation, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase-9 in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2014 Jun;9(6):2491–2498. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2116>
11. Kallakury BV, Karikehalli S, Haholu A, Sheehan CE, Azumi N, Ross JS. Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001 Oct;7(10):3113–3119.
12. Cherdantseva TM, Bobrov IP, Varlamov SV, Myadelets MN, Klimachev IV, Avdalyan AM, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 in renal cell carcinoma. *Cancer Urology*. 2018;14(3):17–24. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2018-14-3-17-24>

13. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF- β and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019 Mar;41:702–710. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.033>
14. Gómez-Gil V. Therapeutic Implications of TGF β in Cancer Treatment: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 20;13(3):379. <https://doi.org/10.3390/cancers13030379>

Информация об авторах:

Тарасенко Артём Игоревич – к.м.н., заместитель директора по инновационному развитию Института урологии и репродуктивного здоровья ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3258-8174>, SPIN: 7456-4963, AuthorID: 715646, Scopus Author ID: 57199647114

Росоловский Антон Николаевич ✉ – д.м.н., заместитель директора, доцент кафедры урологии НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9810-4363>, SPIN: 4622-7095, AuthorID: 665930, ResearcherID: AAD-4866-2021, Scopus Author ID: 57203353149

Березинец Оксана Леонидовна – к.м.н., старший научный сотрудник НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1053-2874>, SPIN: 9793-7772, AuthorID: 759235, ResearcherID: AAD-4898-2021, Scopus Author ID: 36665823100

Бучарская Алла Борисовна – к.б.н., старший научный сотрудник НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0503-6486>, Scopus Author ID: 11738772400

Пахомий Светлана Сергеевна – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8540-6901>, Scopus Author ID: 56048180800

Ефимова Алена Олеговна – к.м.н., врач-дерматовенеролог, ГКУ «Центральный клинический госпиталь ФТС России», г. Москва, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0548-8231>, SPIN: 6877-0056, AuthorID: 1039569

Маслякова Галина Никифоровна – д.м.н., старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, г. Саратов, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8834-1536>, Scopus Author ID: 8960549800

Information about authors:

Artem I. Tarasenko – Cand. Sci. (Med.), deputy director for innovative development of the Institute of Urology and Reproductive Health I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3258-8174>, SPIN: 7456-4963, AuthorID: 715646, Scopus Author ID: 57199647114

Anton N. Rossolovskiy ✉ – Dr. Sci. (Med.), deputy director, associate professor of the department of urology of the Research Institute of Fundamental and Clinical Urology Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9810-4363>, SPIN: 4622-7095, AuthorID: 665930, ResearcherID: AAD-4866-2021, Scopus Author ID: 57203353149

Oksana L. Berezinets – Cand. Sci. (Med.), senior research fellow at the Research Institute of Fundamental and Clinical Urology Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1053-2874>, SPIN: 9793-7772, AuthorID: 759235, ResearcherID: AAD-4898-2021, Scopus Author ID: 36665823100

Alla B. Bucharskaya – Cand. Sci. (Biol.), senior research fellow at the Research Institute of Fundamental and Clinical Urology Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0503-6486>, Scopus Author ID: 11738772400

Svetlana S. Pakhomiy – Cand. Sci. (Med.), associate professor at the department of pathological anatomy Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8540-6901>, Scopus Author ID: 56048180800

Alena O. Efimova – Cand. Sci. (Med.), dermatovenerologist Central Clinical Hospital of the Federal Customs Service of Russia, Moscow, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0548-8231>, SPIN: 6877-0056, AuthorID: 1039569

Galina N. Maslyakova – Dr. Sci. (Med.), senior research fellow Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8834-1536>, Scopus Author ID: 8960549800

Вклад авторов:

Тарасенко А. И., Росоловский А. Н., Березинец О. Л., Маслякова Г. Н. – концепция и дизайн исследования;

Тарасенко А. И., Росоловский А. Н., Березинец О. Л., Бучарская А. Б., Пахомий С. С., Ефимова А. О. – написание статьи;

Тарасенко А. И., Росоловский А. Н., Ефимова А. О. – утверждение рукописи для публикации.

Authors contribution:

Tarasenko A. I., Rossolovskiy A. N., Berezinets O. L., Maslyakova G. N. – research concept and design;

Tarasenko A. I., Rossolovskiy A. N., Berezinets O. L., Bucharskaya A. B., Pakhomiy S. S., Efimova A. O. – writing an article;

Tarasenko A. I., Rossolovskiy A. N., Efimova A. O. – approval of the manuscript for publication.