

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ТРАНСКРИПТОМНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМОЙ И ЖИРОВЫМ ГЕПАТОЗОМ

Юрьева Е.А., Шапошников А.В., Кутилин Д.С.

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru*

Дифференциальная диагностика гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) и оценка функционального состояния печени при этих заболеваниях имеют важное значение для современной онкологии. Огромный потенциал в этом направлении имеет определение таких показателей, как копияность генов (CNV) и уровень транскриптов микроРНК в плазме крови больных. Поэтому целью исследования стал скрининг генетических (CNV) и транскриптомных (микроРНК) маркеров – регуляторов функционального состояния печени у пациентов с ГЦК и НАЖБП. Работа выполнена на 50 больных ГЦК, 30 больных НАЖБП и 20 донорах без патологии. Оценку показателя относительной копияности генов и уровня транскриптов микроРНК проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени. У больных ГЦК обнаружены увеличение копияности генов *GGT1*, *GGTLC1*, *GOT1* и снижение копияности *CYC1* относительно этого показателя в плазме крови здоровых доноров. Группы больных ГЦК и НАЖБП отличались по копияности во вДНК 6 генов: *GOT1*, *AK4*, *GGT1*, *GGTLC1*, *CYC1* и *ALPL*. Было определено 4643 микроРНК, таргетирующих локусы *GGTLC1*, *CYC1*, *LRRC24*, *AK4*, *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* и *ALPL*, из которых 49 микроРНК имели наиболее стабильное взаимодействие с генами. Анализ экспрессии этих микроРНК проводили на образцах плазмы крови больных ГЦК и НАЖБП. Обнаружены статистически значимое ( $p < 0,005$ ) увеличение экспрессии miR-7706 и miR-6775-5p у больных НАЖБП, снижение экспрессии miR-671-5p, miR-2467-3p, miR-939-3p, miR-10401-5p, miR-6786-5p и miR-6805-3p у больных ГЦК, при этом увеличение экспрессии микроРНК miR-4730, miR-1976 и -miR-6774-5p. Таким образом, выявленные отличия по экспрессионному профилю микроРНК и по копияности генов для больных ГЦК и НАЖБП могут служить маркерами данных заболеваний и объяснением молекулярных основ различного функционального состояния клеток печени.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, неалкогольная жировая болезнь печени, регуляторы функционального состояния печени, копияности генов, микроРНК.

*Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП НМИЦ онкологии МЗ РФ, <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>.*

## GENETIC AND TRANSCRIPTOMIC REGULATORS OF THE LIVER FUNCTIONAL STATE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND FATTY HEPATOSIS PATIENTS

Yurieva E.A., Shaposhnikov A.V., Kutilin D.S.

*National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru*

Hepatocellular carcinoma (HCC) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) differential diagnosis and assessment of liver functional state in these diseases are important for modern oncology. Determination gene copy number (CNV) and microRNA transcripts level in the patient's blood plasma has enormous potential in this direction. Therefore, the study purpose was to screen genetic (CNV) and transcriptomic (microRNA) markers-regulators of liver functional state in HCC and NAFLD patients. The work was performed on 50 patients with HCC, 30 patients with NAFLD and 20 donors without pathology. The relative CNV and microRNA level were assessed using RT-PCR. In HCC patients *GGT1*, *GGTLC1*, *GOT1* copy increase and *CYC1* copy decrease were found relative to healthy donors blood plasma. The HCC and NAFLD patients differed in the CNV of 6 genes in cfDNA: *GOT1*, *AK4*, *GGT1*, *GGTLC1*, *CYC1* and *ALPL*. 4643 miRNAs were identified targeting the *GGTLC1*, *CYC1*, *LRRC24*, *AK4*, *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* and *ALPL*, of which 49 miRNAs had the most stable interaction with genes. These microRNAs expression analysis was carried out on blood plasma HCC and NAFLD patients. A statistically significant ( $p < 0.005$ ) expression increase of miR-7706 and miR-6775-5p was found in NAFLD patients, expression decrease of miR-671-5p, miR-2467-3p, miR-939-3p, miR-10401-5p, miR-6786-5p and miR-6805-3p in HCC patients, with expression increase of miR-4730, miR-1976 and miR-6774-5p. Thus, the identified differences in the microRNA expression and gene CNV for patients with HCC and NAFLD can serve as markers of these diseases and explain the molecular basis of the liver cells different functional state.

Keywords: hepatocellular carcinoma, non-alcoholic fatty liver disease, regulators of the liver functional state, gene copy number, microRNA.

*The work was carried out using scientific equipment of the Center for Shared Use, National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>.*

Рак печени является четвертым по летальности онкологическим заболеванием в мире, а гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) составляет 75–85% случаев рака печени [1]. В 2018 году смертность от ГЦК составила 782 000 случаев в мире, несмотря на появление многих современных методов диагностики и лечения, что составляет около 3,5% всех смертей в мире [2, 3]. В России показатель смертности составляет около 9 800 случаев в год [4]. Помимо высокой смертности, прогноз и лечение ГЦК неоптимальны, у большинства пациентов злокачественное новообразование прогрессирует в течение года после постановки диагноза [1].

В значительной мере высокая летальность обусловлена не только поздней диагностикой и распространенностью процесса, но и развивающейся, как правило, гепатоцеллюлярной недостаточностью. В России и за рубежом опубликовано значительное количество фундаментальных исследований, посвященных определенным аспектам функциональных состояний печени при различных заболеваниях [5].

Однако научные достижения последних 10–20 лет могут позволить по-новому взглянуть на функции печени при онкологической патологии. В практике врачебной деятельности важнейшее значение приобретают многофакторные методы оценки функции печени на основании клинических, биохимических, морфологических и аппаратно-инструментальных данных. Большое, иногда определяющее, значение эта информация приобретает в онкологии, поскольку ряд злокачественных новообразований печени: гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциномы, опухоли желчевыводящих протоков, а также коморбидные заболевания – изменяют как морфологическую структуру, так и ее функции. Кроме того, печень нередко подвергается побочным токсическим влияниям целого ряда химиотерапевтических, системных и таргетных препаратов, широко применяемых в онкологии [6].

Развитие гепатотоксичности имеет место у 10–50% онкологических больных. В этих условиях особое значение приобретают методы клинической оценки функции печени, основанные на биохимических показателях (аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АлТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), гамма-глутамилтрансфераза, общий билирубин, альбумин) [7].

Однако все большую ценность приобретают не их изолированные изменения, а интегральные показатели – индексы. В литературе известны более 20 индексов: индекс соотношения аспартатаминотрансферазы и тромбоцитов (APRI) [8]; система подсчета FIB-4 – комбинация возраста пациента, количества тромбоцитов, АСТ и АлТ [9]; индекс ALBI, рассчитываемый на основании уровня альбумина и общего билирубина плазмы крови [10]; показатель R – отношение активности АлТ (кратность к верхнему пределу нормы (ВПН)) к ЩФ (кратность к ВПН), в том числе его повторная оценка в процессе наблюдения за больным, и др. [11].

Вместе с тем, очевидно, что функциональное состояние печени регулируется на генетическом и транскриптомном уровнях [1]. При этом регуляция функций печени на молекулярном уровне недостаточно изучена, имеются лишь отдельные работы, посвященные этой проблеме [12].

Известно, что пациенты с ГЦК и неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП, жировым гепатозом) имеют различные генетические профили, и эти различия могут быть применены для раннего скрининга и прогнозирования течения заболевания, оценки функционального состояния печени. Огромный потенциал в этом направлении имеет определение таких показателей, как копияность генов (CNV) и уровень транскриптов микроРНК в плазме крови больных ГЦК и НАЖБП, для дифференциальной диагностики этих двух патологий. Также важно провести ассоциативный и корреляционный анализ уровня стандартных биохимических и молекулярных маркеров.

Copy number variation (CNV) представляет собой особый тип вариабельности генетической информации, отражающий дозу гена (число его копий) и опосредованно влияющий на его транскрипционную активность [13, 14]. Уровень CNV можно определять во внеклеточной ДНК (внДНК), циркулирующей в плазме крови [15]. Также показателем, доступным для определения в плазме крови, является уровень транскриптов микроРНК. МикроРНК – это короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов, катализируя разрушение мРНК либо ингибируя трансляцию мРНК в белок. МикроРНК вносят значительный вклад в инициацию и развитие различных молекулярных событий, включая онкогенез, прогрессирование и метастазирование опухолей, что делает микроРНК потенциальными биомаркерами [16].

Поэтому целью исследования стал скрининг генетических (CNV) и транскриптомных (микроРНК) маркеров – регуляторов функционального состояния печени у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой и жировым гепатозом.

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России за период с 2020 по 2023 гг. Проанализированы данные комплексного клинического и молекулярного обследования 50 больных гепатоцеллюлярной карциномой (по Барселонской классификации «А», «В», «С», «D») и 30 больных неалкогольной жировой болезнью печени, а также 20 доноров без патологии (группа условно здоровых доноров).

Для получения вДНК использовали кровь, взятую путем венопункции у больных ГЦК, больных неалкогольной жировой болезнью печени и у доноров без патологии (группа условно здоровых доноров). Плазму крови отделяли центрифугированием (30 минут, 2000 об/мин,  $t=10^{\circ}\text{C}$ ). Из плазмы выделяли вДНК фенол-хлороформным методом в модификации Д.С. Кутилина и соавторов [17]. Оценку показателя относительной копийности генов проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). Разработку последовательности синтетических олигонуклеотидов (праймеров) осуществляли с помощью Primer-BLAST и базы данных GenBank (NCBI). В качестве референсного гена для нормализации полученных показателей RT-qPCR был выбран *GAPDH*.

Реакция амплификации проводилась на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США) в 20 мкл смеси, содержащей матрицу вДНК (не менее 0,5 нг), 0,2 мМ раствор dNTP, 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, 2,5 мМ раствор  $\text{MgCl}_2$ , 1X ПЦР-буфер с интеркалирующим красителем EvaGreen и 0,1 е.а./мкл *SynTaq* ДНК-полимеразы [17]. Амплификация осуществлялась по следующей программе:  $95^{\circ}\text{C}$  3 минуты, 40 циклов:  $95^{\circ}\text{C}$  10 секунд,  $55^{\circ}\text{C}$  30 секунд (чтение оптического сигнала по каналу FAM) и  $72^{\circ}\text{C}$  20 секунд.

Относительную копийность ( $rC$ ) рассчитывали по формуле, описанной Д.С. Кутилиным [18]:

$$rC = rC_o/rC_n = E^{-\Delta C_t(\text{образцов от больных})}/E^{-\Delta C_t(\text{образцов от условно здоровых})},$$

где  $E$  – эффективность ПЦР-амплификации, рассчитанная по формуле  $E = 10^{-1/k}$  ( $k$  – коэффициент уравнения прямой  $C(T) = k \cdot \log P_0 + b$ , полученной в ходе линейной аппроксимации данных экспериментальных постановок ПЦР) (усредненное значение  $E=1,914$ ), а  $\Delta C_t$  – разница между средним геометрическим  $C_t$ (гена-мишени) и средним геометрическим  $C_t$ (референсного гена) [18].

С помощью биоинформационного алгоритма TarPmiR определяли микроРНК, таргетирующие локусы *GGTLC1*, *CYC1*, *LRRC24*, *AK4*, *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* и *ALPL*.

Выделение микроРНК из образцов плазмы крови проводили с использованием набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия) на автоматической станции выделения Qiacube Connect (Qiagen, Германия) с учетом рекомендаций производителя.

Для выявления зрелых микроРНК и малой РНК U6 использовали метод, описанный I. Valcells и соавторами [19]. Выделенную суммарную РНК использовали в реакции обратной

транскрипции, которую проводили одновременно с полиаденилированием РНК, с использованием специфичных RT-праймеров. Далее проводили детекцию полученной кДНК с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров осуществляли также с использованием алгоритма I. Valcells и соавт. [19]. Для каждой микроРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции в одном повторе.

Изменение относительной экспрессии микроРНК оценивали методом ПЦР-РВ. Амплификацию проводили в 20 мкл PCR-смеси, содержащей 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Полученные смеси инкубировали в амплификаторе CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистическую обработку результатов выполняли в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения показателей оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости  $p < 0,05$ , для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Для оценки взаимосвязи исследуемых показателей использовали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

На рисунке 1 представлена сводная информация по клинически применяемым в настоящее время маркерам у группы пациентов и здоровых доноров, отобранных в наше исследование.

Как видно из представленных на рисунке 1 данных, у пациентов с ГЦК относительно здоровых доноров статистически значимо ( $p < 0,005$ ) повышена активность АЛТ, АСТ, ГГТ и щелочной фосфатазы, а также снижена концентрация альбумина.

Был проведен анализ показателя копийности генов АЛТ, АСТ, ГГТ, щелочной фосфатазы, альбумина и ассоциированных с ними генов в образцах вДНК у пациентов с ГЦК, больных неалкогольной жировой болезнью печени и у доноров без патологии. У больных ГЦК было обнаружено увеличение копийности гена *GGT1* (Gamma-Glutamyltransferase 1) в 2,5 раза ( $p < 0,005$ ), *GGTLC1* (Gamma-Glutamyltransferase Light Chain 1) в 3,0 раза ( $p < 0,05$ ), *GOT1* в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение показателя копийности гена *CYC1* (*Cytochrome C1*) в 4,4 раза ( $p < 0,005$ ) относительно этого показателя в плазме крови здоровых доноров. Копийность гена *LRRC24* (Leucine Rich Repeat Containing 24) была повышена в 2,0 раза ( $p < 0,005$ ), гена *AK4* (Adenylate Kinase 4) в 3,4 раза ( $p < 0,05$ ), *GGT1* в 1,5 раза ( $p < 0,005$ ), *GGTLC1* в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ), *ALPL* в 2,6 раза ( $p < 0,05$ ) и снижена копийность *CYC1* в 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) у больных жировой болезнью печени относительно здоровых доноров

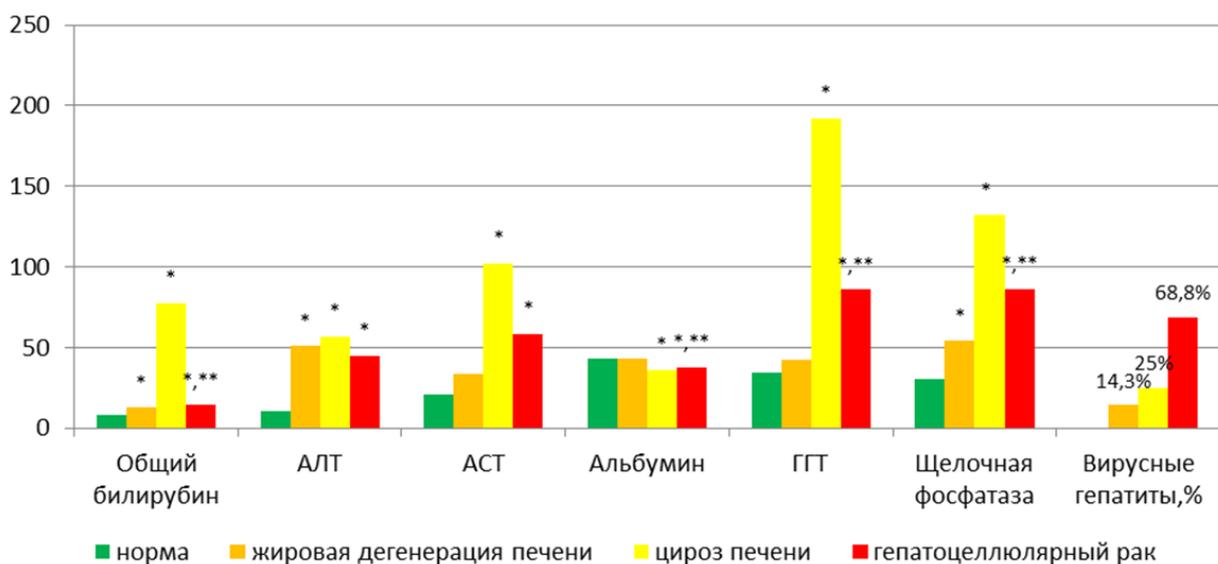


Рис. 1. Характеристика групп по биохимическим маркерам

\* – статистически значимые отличия относительно условно здоровых доноров.

\*\* – статистически значимые отличия между больными ГЦК и пациентами с неалкогольной жировой болезнью печени

Группы больных ГЦК и жировой болезнью печени отличались по копийности во вДНК 5 генов: копийность *GOT1* (*AST1*) была выше у больных ГЦК в 1,9 раза ( $p < 0,005$ ), копийность *AK4* была ниже у больных ГЦК в 2,1 раза ( $p < 0,0005$ ), копийность *GGT1* была выше у больных ГЦК в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), копийность *GGTLC1* была выше у больных ГЦК в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), копийность *CYC1* была ниже у больных ГЦК в 2,2 раза ( $p < 0,005$ ) и копийность гена *ALPL* была ниже у больных ГЦК в 2,1 раза ( $p < 0,005$ ) (рис. 2).

Ген *ALB* кодирует самый распространенный белок в крови человека – альбумин. Этот белок участвует в регуляции коллоидно-осмотического давления плазмы крови и действует как белок-носитель для широкого спектра эндогенных молекул, включая гормоны, жирные кислоты и билирубин, а также экзогенные лекарственные средства. Кроме того, этот белок проявляет эстеразоподобную активность с широкой субстратной специфичностью.

Кодируемый препропротеин подвергается протеолитической обработке с образованием зрелого белка. Пептид, полученный из этого белка, EPI-X4, является эндогенным ингибитором хемокинового рецептора CXCR4. Наибольший уровень экспрессии данного гена наблюдается в печени.

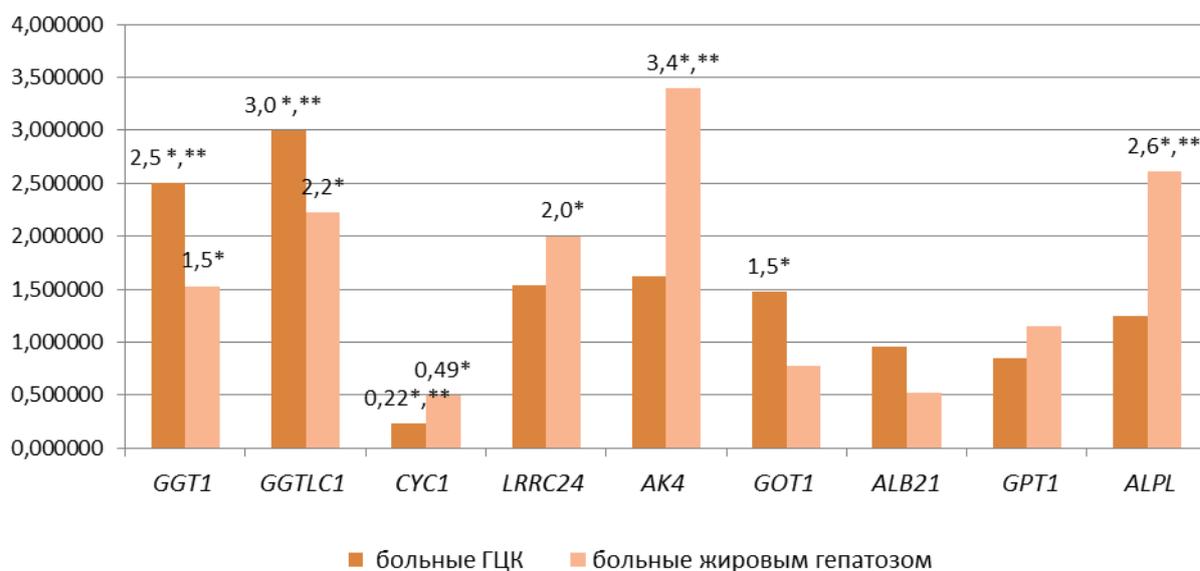


Рис. 2. Показатель копийности генов во вДНК пациентов с ГЦК и жировым гепатозом

Кодируемый препропротеин подвергается протеолитической обработке с образованием зрелого белка. Пептид, полученный из этого белка, EPI-X4, является эндогенным ингибитором хемокинового рецептора CXCR4. Наибольший уровень экспрессии данного гена наблюдается в печени. Ген *ALB* задействован в целом ряде клеточных сигнальных путей (Reactome pathways): метаболизм желчных кислот и желчных солей, регуляция уровня билирубина, транспорт липидов, метаболизм липопротеинов и трансмембранный транспорт малых молекул.

Ген *GOT1* кодирует глутамин-оксалоуксусную трансаминазу 1 (аспартатаминотрансфераза, цитоплазматическая, АСТ), которая играет важную роль в метаболизме аминокислот, циклах мочевины и трикарбоновых кислот, участвует в синтезе глюкозы в печени.

Ген *GGT1* кодирует фермент гамма-глутамилтрансферазу 1, который катализирует перенос глутамильной части глутатиона на множество аминокислот и акцепторов дипептидов. Он экспрессируется в тканях, участвующих в абсорбции и секреции, и может способствовать этиологии диабета и других нарушений обмена веществ.

Ген *ALPL* кодирует фермент щелочную фосфатазу, которая метаболизирует различные фосфатные соединения и играет ключевую роль в минерализации скелета и адаптивном термогенезе [20].

Ген *GPT1* кодирует эндогенный фермент аланинаминотрансферазу (АЛТ, АлАт) из группы трансфераз, широко используемый в медицинской практике для лабораторной диагностики повреждений печени. Аланинаминотрансфераза синтезируется внутриклеточно, и в норме лишь небольшая часть этого фермента попадает в кровь. При повреждении печени

(при гепатитах, циррозе печени) в результате цитолиза (разрушения клеток) этот фермент попадает в кровь, что выявляется лабораторными методами. Уровень этой трансаминазы может повышаться также при инфаркте миокарда и других состояниях [21].

Ген *CYC1* кодирует белок Cytochrome C1 – компонент убихинол-цитохром с оксидоредуктазы, многосубъединичного трансмембранного комплекса, который является частью митохондриальной цепи переноса электронов, которая управляет окислительным фосфорилированием.

Ген *AK4* кодирует фермент аденилат киназу (Adenylate Kinase 4), который участвует в поддержании гомеостаза клеточных нуклеотидов путем катализа взаимного превращения нуклеозидфосфатов, а также играет защитную роль в клеточном ответе на окислительный стресс.

Ген *GGTLC1* кодирует легкую цепь гамма-глутамилтрансферазы 1 – представителя семейства гамма-глутамилтранспептидаз (ГГТ), которые играют важную роль в метаболизме глутатиона.

Межгенная сеть взаимодействий для локусов *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* и *ALPL* представлена на рисунке 3.

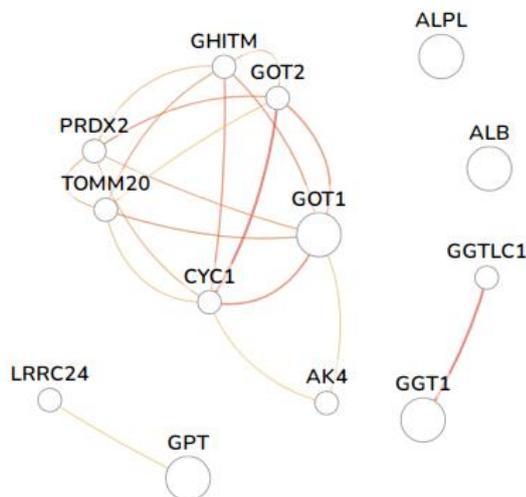


Рис. 3. Межгенная сеть взаимодействий для локусов *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* и *ALPL*.  
(Изображение получено при анализе открытых баз данных на языке R)

Гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) – ферменты, участвующие в обмене аминокислот. Катализируют перенос гамма-глутамилового остатка с гамма-глутамилового пептида на аминокислоту, другой пептид или, при гидролизе, на воду. Накапливается в основном в почках, печени и поджелудочной железе. В клетках локализуется в мембране, лизосомах и цитоплазме [22]. ГГТ преимущественно используется в качестве диагностического маркера

заболеваний печени. Повышенная активность ГГТ в сыворотке может быть обнаружена при заболеваниях печени, желчевыводящих путей, поджелудочной железы и почек [23]. Гены *GGT* и *GGTLC1* экспрессируются на высоких уровнях во многих различных опухолях. Известно, что они ускоряют рост опухоли и повышают устойчивость к цисплатину [24].

Ген *LRRC24* кодирует трансмембранный белок, функция которого в настоящее время неизвестна. Он является членом суперсемейства белков с богатыми лейцином повторами (LRR). Было обнаружено, что *LRRC24* взаимодействует с *IGFBP7*, известным регулятором инсулиноподобных факторов роста (IGF), который участвует в стимуляции клеточной адгезии. Также *LRRC24* взаимодействует с *GPT1* (рис. 3). На сегодняшний день ни одно исследование не связывало конкретно *LRRC24* или ген *LRRC24* с каким-либо клинически значимым случаем [25].

Для сопоставления клинических и молекулярно-генетических маркеров рассмотрим таблицу 1.

Таблица 1

Сопоставление биохимических показателей и молекулярно-генетические изменений у больных ГЦК и жировым гепатозом

Группа	АЛТ	АЛТ <sub>CNV</sub>	АСТ	АСТ <sub>CNV</sub>	ГГТ	ГГТ <sub>CNV</sub>	ЩФ	ЩФ <sub>CNV</sub>
ГЦК	↑	–	↑	↑	↑	↑	↑	–
НАЖБП	↑	–	–	–	–	↑	↑	↑

«↑» – повышенные значения относительно нормы (контрольная группа)

«–» – нет изменений относительно нормы (контрольная группа)

АЛТ<sub>CNV</sub> – показатель копийности гена АЛТ (*GPT1*), АСТ<sub>CNV</sub> – показатель копийности гена АСТ (*GOT1*), ГГТ<sub>CNV</sub> – показатель копийности гена ГГТ (*GGT1*), ЩФ<sub>CNV</sub> – показатель копийности гена щелочной фосфатазы (*ALPL*)

Из представленных в таблице 1 и на рисунках 1 и 2 данных видно, что изменение активности фермента АЛТ не связано с изменением копийности его гена ( $r=0,086$ ) у пациентов с ГЦК и НАЖБП. Изменение активности фермента АСТ у больных ГЦК ассоциировано с повышением копийности этого гена ( $r=0,757$ ), при этом у пациентов с НАЖБП такой ассоциации не наблюдается ( $r=0,114$ ). Изменение активности фермента ГГТ у больных ГЦК ассоциировано с повышением копийности этого гена ( $r=0,691$ ), при этом у пациентов с НАЖБП такой ассоциации не наблюдается ( $r=-0,104$ ). Изменение активности щелочной фосфатазы у больных ГЦК не ассоциировано с изменением копийности этого гена ( $r=-0,090$ ), при этом у пациентов с НАЖБП наблюдается сильная положительная корреляция активности фермента и копийности его гена ( $r=0,904$ ). В ходе исследования также не обнаружено положительной корреляции между концентрацией альбумина и копийностью его гена во

внДНК пациентов. Хотя для пациентов с НАЖБП между концентрацией альбумина и копийностью гена *ALB* в тканях печени обнаружена положительная корреляция ( $r=0,574$ ).

Также представляет интерес изучение одного из механизмов регуляции транскрипционной активности генов *GGTLC1*, *CYCI*, *LRRC24*, *AK4*, *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* и *ALPL* – изменение экспрессии микроРНК.

С помощью модифицированного биоинформационного алгоритма TarPmiR было определено 4643 микроРНК, таргетирующих локусы *GGTLC1*, *CYCI*, *LRRC24*, *AK4*, *ALB*, *GOT1*, *GPT1*, *GGT1* и *ALPL*. Из этих микроРНК только 588 были валидированы в базе данных miRDB, в том числе 413 микроРНК, образующих наиболее прочные комплексы с соответствующими генами-мишенями (минимальная свободная энергия взаимодействия в паре микроРНК-мРНК): 30 микроРНК для гена *ALB*, 66 микроРНК для *AK4*, 12 микроРНК для *ALPL*, 2 микроРНК для *CYCI*, 35 микроРНК для гена *GGT1*, 47 микроРНК для гена *GGTLC1*, 133 микроРНК для гена *GOT1*, 83 микроРНК для гена *GPT* и 5 микроРНК для гена *LRRC24* (табл. 2).

Таблица 2

Данные по микроРНК-мРНК взаимодействию, полученные с использованием алгоритма TarPmiR

	микроРНК	Ген	Участок взаимодействия	энергия связи
1	hsa-miR-3180	ALB	TGGGGCGGAGCTTCCGGAG#CTGTGGAAGTCCAGTGTCTC#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.0
2	hsa-miR-4429	ALB	AAAAGCTGGGCTGAGAGGCG#GCATCTCAGCCTACCA#...(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.0
3	hsa-miR-5004-3p	ALB	CTTGGATTTTCCTGGGCCTCAG#CTGTAGGTTCTGTGGAAGTCCAGT#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.0
4	hsa-miR-330-3p	ALB	GCAAAGCACCGGCTGCAGAGA#TTCTGTAGGTTCTGTGG#.....(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.2
...	hsa-miR-1251-5p	AK4	ACTTAGCTGCCAAAGGCGCT#TGCCTTTGGAGTTGGGAGA#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.0
32	hsa-miR-4724-5p	AK4	AACTGAACCGAGTGTGCTCG#GCCCTCTGGTAACAGTG#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.0
33	hsa-miR-6833-5p	AK4	GTGTGGAAGATGGGAGGAGAAA#TCTCCCCATCCCCACAA#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.1
34	hsa-miR-509-3-5p	AK4	TACTGCAGACGTGGCAATCATG#ATGGAGCTAGTCCATGTCTGTAGTC#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.2
35	hsa-miR-34a-5p	AK4	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT#CCAGCTAAATGGACAATTCTAGCCAA#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.2
36	hsa-miR-7110-3p	AK4	TCTCTCTCCCACTCCCTGCAG#GTAGGGAAGGAGAAAGGT#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.4
37	hsa-miR-6873-5p	AK4	CAGAGGGAATACAGAGGCAAT#GCTTTCTGGTGTGTGCCCTCTGG#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.4
38	hsa-miR-1185-2-3p	AK4	ATATACAGGGGGAGACTCTCAT#GGGAGTCCCAATTTGATCATTTTGTGTGTG#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.5
39	hsa-miR-371b-5p	AK4	ACTCAAAGATGGCGGCACTT#AAAGTGTCTGCTAACTATTGAT#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.7
40	hsa-miR-4747-5p	AK4	AGGGAAGGAGGCTTGGTCTTAG#AAGACTGAGCTTTTCTCTG#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.8
41	hsa-miR-449a	AK4	TGGCAGTGTATTGTAGCTGGT#CCAGTGAATCCTCTGTCAATTCAGTCCAT#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.8
...	hsa-miR-520a-5p	ALP L	CTCCAGAGGGAAGTACTTTCT#GGACCCAAGAAACCAAGTCTGCCGCCACC TCGTCCCTCTGGAA#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-21.1
98	hsa-miR-525-5p	ALP L	CTCCAGAGGATGCATTTCT#AGAAAGGGGACCCAAGAAACCAAGTCTGCC GCCACCTCGCTCCCTCTGGAA#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-22.0
99	hsa-miR-4784	ALP L	TGAGGAGATGCTGGGACTGA#TCCAGTCTCATCTCTGAC#(((((((((((((((#).))))))))))...))))).	-22.1

100	hsa-miR-6883-5p	ALP L	AGGGAGGGTGTGGTATGGATGT#ACATTCTGGATCTGACCCTCCA#(((((((...(((.((((#))))))...)))...)))))))).	-24.5
101	hsa-miR-4487	ALP L	AGAGCTGGCTGAAGGGCAG#CTGCCCTTTGGCCAA#.....(((((((((((#)))))))))...)).	-25.5
102	hsa-miR-4728-5p	ALP L	TGGGAGGGGAGAGGCAGCAAGCA#CTGACCCTCCCCTCCCAT#(((((((((((...(((...#)))...)))...)))))))).	-26.8
103	hsa-miR-2467-3p	ALP L	AGCAGAGGCAGAGAGGCTCAGG#TCTGGCCTCCAGCCTTTGCTC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-28.3
108	hsa-miR-23a-5p	ALP L	GGGGTTCCTGGGGATGGGATTT#AATGCTCATGTCCCTGTCCCCAGGCCAGCCCTC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-32.8
...	hsa-miR-1976	CY C1	CCTCTGCCCTCCTTGCTGT#GCCTCTCTCATCTGGAAGAAGAGGCAAGGGGGCAGGAGA#(((((((((((...(((...#)))))))))...)))))))).	-32.8
110	hsa-miR-6774-5p	CY C1	ACTTGGGCAGGAGGGACCCTGTATG#CATCCTGCCAGAACAGGCCCTCAAGCCCAAGA#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-30.4
111	hsa-miR-1236-5p	GG T1	TGAGTGACAGGGGAAATGGGGA#CCGGCTTCCCCTGTGAGCA#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
112	hsa-miR-3689a-5p	GG T1	TGTGATATCATGGTCTGGGA#TCCAGGGACAAGATACTCACC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
113	hsa-miR-3689b-5p	GG T1	TGTGATATCATGGTCTGGGA#TCCAGGGACAAGATACTCACC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
114	hsa-miR-3689e	GG T1	TGTGATATCATGGTCTGGGA#TCCAGGGACAAGATACTCACC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
145	hsa-miR-3194-3p	GG T1	AGCTCTGCTGCTCACTGGCAGT#CCTGTGAGCAGCAGAGCA#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-32.6
146	hsa-miR-26b-3p	GG TLC 1	CCTGTCTCCATTACTTGGCT#CCAGGACGAGGAAGAGGACTTTGGGGGACAGGC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.1
147	hsa-miR-425-3p	GG TLC 1	ATCGGGAATGTCGTGTCGCCCG#GGGGGACAGGCTTCTCTGT#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.2
148	hsa-miR-1275	GG TLC 1	GTGGGGGAGAGGCTGTG#GGCCTGTCTCCCCA#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.5
...	hsa-miR-4514	GO T1	ACAGGCAGGATTGGGGAA#TCCCTAGTCCTAAGCTTT#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
194	hsa-miR-1185-2-3p	GO T1	ATATACAGGGGGAGACTCTCAT#GAGTGTCTGGTCTCCCTGC#.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
195	hsa-miR-2276-3p	GO T1	TCTGCAAGTGTGAGAGGCGAGG#GACACTTGCAGGA#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
196	hsa-miR-3153	GO T1	GGGAAAGCGAGTAGGGACATTT#GTGTCCCTAGTCCTAAGCTTTG#.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.1
197	hsa-miR-320c	GO T1	AAAAGCTGGGTTGAGAGGGT#ATCATCTCAACCCAGA#.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.3
198	hsa-miR-1278	GO T1	TAGTACTGTGCATATCATCTAT#AGTTTTACCAAACAGTATTTACTCGTGATGTGCGTAGTGA#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.3
...	hsa-miR-4473	GPT	CTAGTCTCTCCGTTACAAGTA#TACTGTCTTGTATGCCTGGCGGGGTGGGGTGGGGGGGTGCTGGG#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.0
327	hsa-miR-492	GPT	AGGACCTGCGGGACAAGATTCTT#TCTCTGCAGGTCCC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.1
328	hsa-miR-5581-5p	GPT	AGCCTTCCAGGAGAAATGGAGA#CCTGGGAGGCTC#(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.1
329	hsa-miR-3126-3p	GPT	CATCTGGCATCCGTCACACAGA#GTGGGGGGGGTGTGGGC#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.5
330	hsa-miR-6875-5p	GPT	TGAGGGACCCAGGACAGGAGA#CCTCCTCTGTCAGGTCCCTA#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.7
331	hsa-miR-3116	GPT	TGCCTGGAACATAGTAGGACT#GGTCCCTAATAAAGCTGTGTGGCAG#(((...(((...#))))))...)))))))).	-21.7
332	hsa-miR-129-1-3p	GPT	AAGCCCTACCCCAAAAAGTAT#TGGGGTGGGGGG#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-22.0
333	hsa-miR-129-2-3p	GPT	AAGCCCTACCCCAAAAAGCAT#TGGGGTGGGGGG#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-22.0
334	hsa-miR-3675-5p	GPT	TATGGGGCTTCTGTAGAGATTC#TCTCTGCAGGTCCCTAA#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-22.0
...	hsa-miR-381-5p	LRR C24	AGCGAGGTTGCCCTTTGTATAT#GCCGGTGCGGCCTCGCG#..(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-21.9
410	hsa-miR-301b-5p	LRR C24	GCTCTGACGAGGTTGCTACT#GGTGCGGCCTCGCGCATGCT#(.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-23.2
411	hsa-miR-489-5p	LRR C24	GGTCGTATGTGTGACGCCATTT#GGCCTCGCGCATGCTCCG#(.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-23.3
412	hsa-miR-4730	LRR C24	CTGGCGAGCCATTCCATGCCA#GGCGCCGGAGATTGGCCGGTGCGGCCTCGCGCATGCTCCG#(.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-27.4
413	hsa-miR-6081	LRR C24	AGGAGCAGTGCAGGCGCAAGGCCCG#GGCGCCGGAGATTGGCCGGTGCGGCCTCGCGCATGCTCCG#(.....(((((((((((...(((...#))))))...)))...)))))))).	-39.8

«...» – разрыв таблицы (конец фрагмента)

Из выявленных микроРНК наиболее стабильное взаимодействие с генами имели 49 (табл. 3).

Таблица 3

Перечень микроРНК, наиболее эффективно взаимодействующих с мРНК генов-мишеней

Ген	микроРНК	Энергия связи
<i>ALB</i>	hsa-miR-7706	-23.3
	hsa-miR-671-5p	-23.4
	hsa-miR-6775-3p	-23.5
	hsa-miR-6849-5p	-23.5
	hsa-miR-4663	-24.1
	hsa-miR-6775-5p	-32.2
<i>AK4</i>	hsa-miR-3663-3p	-28.2
	hsa-miR-4646-5p	-28.2
	hsa-miR-8089	-29.3
	hsa-miR-6796-5p	-30.6
	hsa-miR-767-3p	-33.5
	hsa-miR-661	-34.2
<i>ALPL</i>	hsa-miR-2467-3p	-28.3
	hsa-miR-939-3p	-28.3
	hsa-miR-10401-5p	-28.9
	hsa-miR-149-3p	-29.6
	hsa-miR-6752-3p	-30.9
	hsa-miR-23a-5p	-32.8
<i>CYC1</i>	hsa-miR-1976	-32.8
	hsa-miR-6774-5p	-30.4
<i>GGT1</i>	hsa-miR-135a-3p	-28.1
	hsa-miR-125a-3p	-28.5
	hsa-miR-6824-5p	-30.2
	hsa-miR-1343-5p	-32.2
	hsa-miR-2861	-32.5
	hsa-miR-3194-3p	-32.6
<i>GGTLC1</i>	hsa-miR-4298	-28.3
	hsa-miR-5008-3p	-29.2
	hsa-miR-939-5p	-31.1
	hsa-miR-3194-3p	-33.7
	hsa-miR-6752-5p	-33.9
	hsa-miR-6824-5p	-34.4
<i>GOT1</i>	hsa-miR-4767	-30.2
	hsa-miR-6796-5p	-30.4
	hsa-miR-6762-5p	-30.5
	hsa-miR-8071	-32.2
	hsa-miR-6786-5p	-32.2
	hsa-miR-4763-3p	-41.2
<i>GPT</i>	hsa-miR-4749-3p	-33.1
	hsa-miR-3162-3p	-33.2
	hsa-miR-6729-3p	-33.5
	hsa-miR-3180-5p	-33.9
	hsa-miR-6805-3p	-34.3
	hsa-miR-6806-5p	-35.4
<i>LRRC24</i>	hsa-miR-381-5p	-21.9
	hsa-miR-301b-5p	-23.2
	hsa-miR-489-5p	-23.3
	hsa-miR-4730	-27.4
	hsa-miR-6081	-39.8

Анализ уровня транскриптов этих 49 микроРНК мы провели на образцах плазмы крови больных ГЦК и НАЖБП. В качестве контроля использовали группу условно здоровых

доноров. Результаты представлены на рисунке 4. Обнаружено статистически значимое ( $p < 0,005$ ) увеличение экспрессии hsa-miR-7706 в 1,8 раза и hsa-miR-6775-5p в 2,1 раза у больных НАЖБП и статистически значимое ( $p < 0,005$ ) снижение экспрессии hsa-miR-671-5p в 2,0 раза у больных ГЦК относительно здоровых доноров. Обнаружено увеличение экспрессии hsa-miR-6796-5p в 1,7 раза у больных НАЖБП. У больных ГЦК также выявлено снижение экспрессии hsa-miR-2467-3p, hsa-miR-939-3p и hsa-miR-10401-5p в 2,0, 2,5 и 1,7 раза, hsa-miR-6786-5p и hsa-miR-6805-3p в 2,5 и 5,0 раз относительно здоровых доноров.

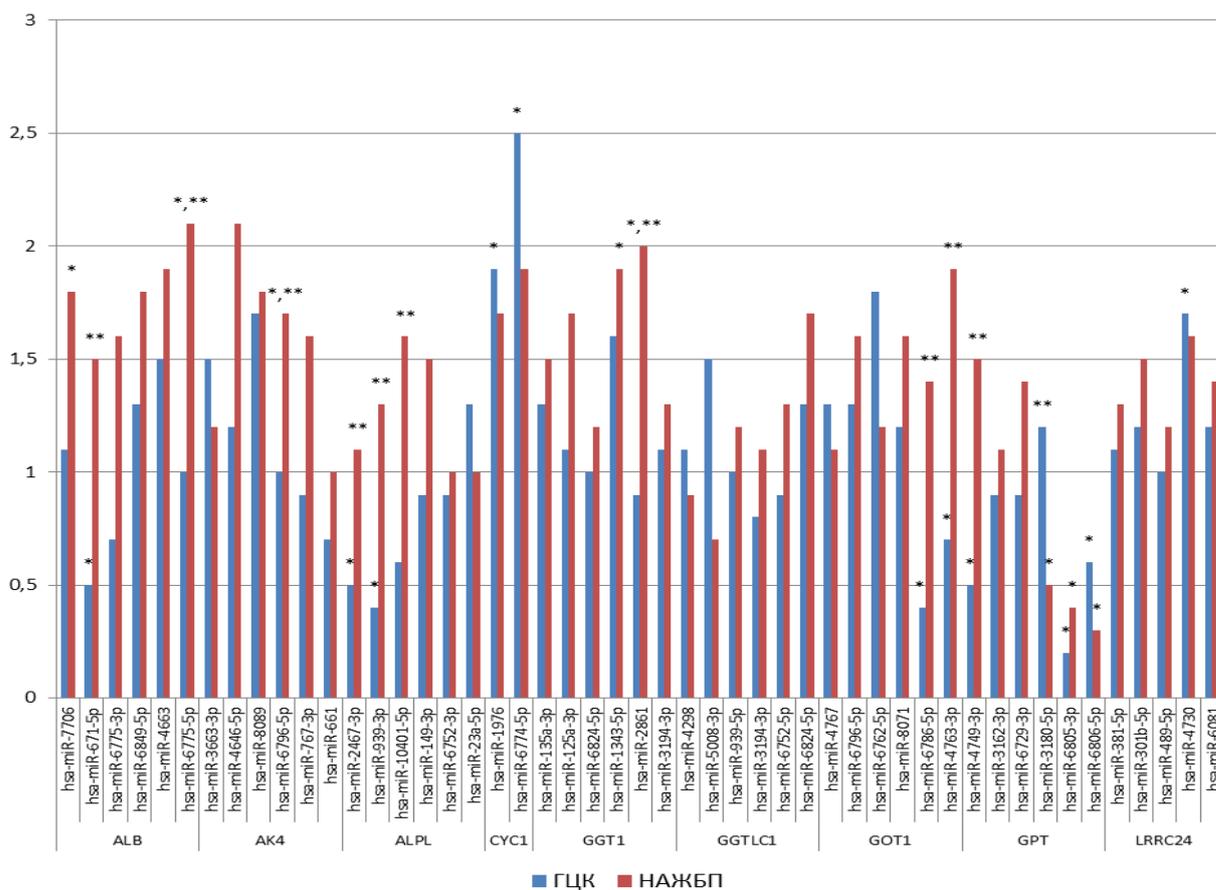


Рис. 4. Уровень экспрессии 49 микроРНК в образцах плазмы крови больных ГЦК и НАЖБП

При этом у данных пациентов наблюдается увеличение экспрессии микроРНК hsa-miR-4730, hsa-miR-1976 и hsa-miR-6774-5p в 1,7, 1,9 и 2,5 раза соответственно.

### Заключение

Таким образом, проведенное комплексное исследование показателей копияности генов и экспрессии микроРНК в плазме крови и сравнение с данными биохимических обследований пациентов с ГЦК и НАЖБП позволило как установить особенности регуляции функционального состояния печени – активности ферментов АЛТ, АСТ, ГГТ и щелочной фосфатазы и концентрации альбумина, так и выявить генетические и транскриптомные маркеры этих заболеваний.

## Список литературы

1. Шапошников А.В., Кит О.И., Кутилин Д.С., Юрьева Е.А. Генетические и эпигенетические особенности и маркеры гепатоцеллюлярных карцином // Современные проблемы науки и образования. 2021. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31086> (дата обращения: 10.10.2023).
2. Asrani S.K., Devarbhavi H., Eaton J., Kamath P.S. Burden of liver diseases in the world // J. Hepatol. 2019. Vol.70 Is. 1. P.151-171. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.
3. Зайратьянц О.В., Ющук Н.Д., Хрипун А.И., Знойко О.О., Гудкова С.Б., Орехов О.О., Красненкова С.Ф., Журавлева А.В. Распространенность инфекции, вызванной вирусами гепатита В и С, по материалам летальных исходов в Москве в 2015-2017 гг. // Архив патологии. 2019. № 81 (2). С. 29-35.
4. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с.
5. Бредер В.В., Лактионов К.К., Давыдов М.М. Лекарственное лечение гепатоцеллюлярного рака: практические вопросы и решения // Медицинский Совет. 2017. (14). С. 11-23. DOI: 10.21518/2079-701X-2017-14-11-23.
6. Ozougwu J.C. Physiology of the liver // International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences 2017. Vol.4. Is. 8. P. 13-24.
7. Church R.J., Watkins P.B. The transformation in biomarker detection and management of drug-induced liver injury // Liver International. 2017. Vol. 37. P. 1582-1590.
8. Wai C.T., Greenson J.K., Fontana R.J., Kalbfleisch J.D., Marrero J.A., Conjeevaram H.S., Lok A.S. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C // Hepatology. 2003. Vol. 38. Is. 2. P. 518-26. DOI: 10.1053/jhep.2003.50346.
9. Sterling R.K., Lissen E., Clumeck N., Sola R., Correa M.C., Montaner J., Sulkowski M., Torriani F.J., Dieterich D.T., Thomas D.L., Messinger D., Nelson M. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection // Hepatology. 2006. Vol.43. Is. 6. P. 1317-25. DOI: 10.1002/hep.21178.
10. Gui B., Weiner A.A., Noshier J., Lu S.E., Foltz G.M., Hasan O., Kim S.K., Gendel V., Mani N.B., Carpizo D.R., Saad N.E., Kennedy T.J., Zuckerman D.A., Olsen J.R., Parikh P.J., Jabbour S.K. Assessment of the Albumin-Bilirubin (ALBI) Grade as a Prognostic Indicator for Hepatocellular

Carcinoma Patients Treated With Radioembolization // *Am J. Clin Oncol.* 2018. Vol. 41. Is. 9. P. 861-866. DOI: 10.1097/COC.0000000000000384.

11. Ивашкин В.Т., Барановский А.Ю., Райхельсон К.Л., Пальгова Л.К., Маевская М.В., Кондрашина А., Марченко Н.В., Некрасова П., Никитин И.Г. Лекарственные поражения печени (клинические рекомендации для врачей) // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2019. № 29 (1). С. 85-115. DOI:10.22416/1382-4376-2019-29-1-101-131.

12. Sookoian S., Pirola C.J. Genetic predisposition in nonalcoholic fatty liver disease // *Clin Mol Hepatol.* 2017. Vol. 23. Is. 1. P.1-12. DOI: 10.3350/cmh.2016.0109.

13. Kutilin D.S., Tsandekova M.R., Porkhanova N.V. Features of the copy number variation of certain genes in tumor cells in patients with serous ovarian adenocarcinoma // *Bull Exp Biol Med.* 2021. Vol. 170. Is. 3. P. 332–339. DOI: 10.1007/s10517-021-05062-1.

14. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки // *Российский биотерапевтический журнал.* 2022. № 21 (4). С. 41-49. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49.

15. Геворкян Ю.А., Дашков А.В., Солдаткина Н.В., Колесников В.Е., Тимошкина Н.Н., Кутилин Д.С., Бондаренко О.К. Молекулярные особенности злокачественных опухолей желудка // *Южно-Российский онкологический журнал.* 2023. № 4 (1). С. 65-78. DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-7.

16. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г., Зинькович М.С., Савченко Д.А., Шляхова О.В., Фаткина Н.Б., Удаленкова И.А., Гаппоева М.А., Толмачева Е.А. Нарушения в регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и радиорезистентность опухолей прямой кишки // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2021. № 11. С. 12-29.

17. Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Чубарян А.В., Туркин И.Н., Водолажский Д.И., Николаева Н.В., Лысенко И.Б. Изменение относительной копийности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого // *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* 2017. № 3-2 (195-2). С. 74-82.

18. Кутилин Д.С. Регуляция экспрессии генов раково-тестикулярных антигенов у больных колоректальным раком // *Молекулярная биология.* 2020. Т. 54. № 4. С. 580-595.

19. Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers // *BMC biotechnology.* 2011. Vol. 11. Is. 1. P. 70.

20. Numa-Kinjoh N., Komaru K., Ishida Y., Sohda M., Oda K. Molecular phenotype of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with a proline (108) to leucine substitution associated with dominant odontohypophosphatasia // *Mol Genet Metab.* 2015. Vol. 115. Is. 4. P. 180-185. DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.05.006.
21. Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: Справочное пособие. 3-е изд. М., «МЕДпресс-информ», 2007. 320 с.
22. Whitfield J.B. Gamma glutamyl transferase // *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* 2001. Vol. 38. Is. 4. P. 263-355.
23. Endre Z.H., Pickering J.W., Walker R.J., Devarajan P., Edelstein C.L., Bonventre J.V., Frampton C.M., Bennett M.R., Ma Q., Sabbiseti V.S., Vaidya V.S., Walcher A.M., Shaw G.M., Henderson S.J., Nejat M., Schollum J.B., George P.M. Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function // *Kidney Int.* 2011. Vol. 79. Is. 10. P. 1119-1130.
24. Xu L., Chen L., Zhang B., Liu Z., Liu Q., Liang H., Chen Y., Chen X., Leng C., Zhang B. Alkaline phosphatase combined with  $\gamma$ -glutamyl transferase is an independent predictor of prognosis of hepatocellular carcinoma patients receiving programmed death-1 inhibitors // *Front Immunol.* 2023. Vol. 14. P. 1115706. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1115706.
25. Wojtowicz W.M., Vielmetter J., Fernandes R.A., Siepe D.H., Eastman C.L., Chisholm G.B., Cox S., Klock H., Anderson P.W., Rue S.M., Miller J.J., Glaser S.M., Bragstad M.L., Vance J., Lam A.W., Lesley S.A., Zinn K., Garcia K.C. A Human IgSF Cell-Surface Interactome Reveals a Complex Network of Protein-Protein Interactions // *Cell.* 2020. Vol. 182. Is. 4. P. 1027-1043. DOI: 10.1016/j.cell.2020.07.025.