

Экспрессия микроРНК и генов как кандидатов в маркеры прогноза метастазирования рака желудка

Кипкеева Ф.М.¹, Музаффарова Т.А.¹, Никулин М.П.², Мансорунов Д.Ж.¹, Апанович П.В.¹, Малихова О.А.², Карпукхин А.В.¹

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П.Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 — ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава РФ
115478 г. Москва, Каширское ш., 23

Рак желудка (РЖ) является одной из существенных причин смертности от онкологических заболеваний. Неблагоприятный прогноз при РЖ в значительной мере связан с метастазированием опухоли. Экспрессия генов и микроРНК может являться источником биомаркеров, сигнализирующих о повышенном риске метастазирования опухоли. Выявление генов, ассоциированных с метастазированием опухоли, и создание прогностической панели микроРНК и генов, является весьма актуальным. Нами исследована экспрессия микроРНК miR-34a и miR-335 и генов *FGFR2*, *VEGFR1* и *NRP1* при диссеминированном РЖ в сравнении с не метастазирующими опухолями РЖ. Охарактеризована ассоциация с развитием отдаленного метастазирования, указывающая на их качество как кандидатов в маркеры. Сформированы панели, включающая гены и микроРНК – кандидаты в маркеры прогноза. Проведенный сравнительный анализ панелей позволил выбрать в качестве наиболее эффективной панель, включающую miR335/*VEGFR1*/*FGFR2*, которая демонстрирует наилучшие показатели как кандидат прогноза метастазирования, особенно по значению отношения шансов OR = 143 и RR = 7,1.

Ключевые слова: микроРНК, гены, экспрессия, рак желудка, метастазирование, маркеры.

Для цитирования: Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Мансорунов Д.Ж., Апанович П.В., Малихова О.А., Карпукхин А.В. Экспрессия микроРНК и генов как кандидатов в маркеры прогноза метастазирования рака желудка. *Медицинская генетика* 2021; 20(11): 18-24.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.11.18-24

Автор для корреспонденции: Кипкеева Фатимат Магомедовна, e-mail: brca1@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 10.11.2021.

The expression of microRNA and genes as candidates for the gastric cancer metastasis markers

Kipkeeva F.M.¹, Muzaffarova T.A.¹, Niklin M.P.², Mansorovov D.Zh.¹, Apanovich P.V.¹, Malikhova O.A.², Karpukhin A.V.¹

1 — Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

2 — N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation
23, Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

Gastric cancer (GC) is one of the significant causes of mortality from cancer. An unfavorable forecast for GC is largely associated with tumor metastasis. Expression of genes and microRNAs can be a source of biomarkers that signal the increased risk of tumor metastasis. The detection of genes associated with tumor metastasis, and the creation of a candidate prognostic panel of microRNAs and genes is very relevant. We investigated the expression of MIR-34A and MIR-335 microRNA and *FGFR2*, *VEGFR1* and *NRP1* genes with disseminated gastric cancer in comparison with non-metastatic GC tumors. Association is characterized with the development of remote metastasis, indicating their quality as candidates for markers. Panels are formed, including genes, and microRNAs – candidates for prognostic markers. A comparative analysis of the panels allowed to be characterized as the most efficient panel, including MIR335/*VEGFR1*/*FGFR2*, which demonstrates the best indicators as a candidate for the metastasis prediction panel, especially the value of the ratio of the chance of OR = 143 and RR = 7.1.

Keywords: microRNA, genes, expression, stomach cancer, metastasis, markers.

For citation: Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Niklin M.P., Mansorovov D.Zh., Apanovich P.V., Malikhova O.A., Karpukhin A.V. The expression of microRNA and genes as candidates for the gastric cancer metastasis markers. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(11): 18-24. (In Russ.)

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.11.18-24

Corresponding author: Fatimat M. Kipkeeva, e-mail: brca1@mail.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 10.11.2021.

Введение

Как желудка (РЖ) является одной из основных причин смертности от онкологических заболеваний. Неблагоприятный прогноз при РЖ в значительной мере связан с метастазированием опухоли. Несмотря на разработку новых схем лечения и применение препаратов таргетной и иммунотерапии, общая выживаемость пациентов при РЖ с отдаленными метастазами составляет менее двух лет [1]. Таким образом, выявление генов, ассоциированных с метастазированием опухоли, является весьма актуальным. В метастазировании рака (в том числе и РЖ) одну из ключевых ролей играет ангиогенез. На стадии *in situ* опухоль получает кислород и питательные вещества путем диффузии из капилляров, находящихся под базальной мембраной эпителиального слоя. По мере роста опухоли, простой диффузии уже недостаточно для поддержания ее метаболизма. В ее клетках, находящихся удаленно от кровоснабжения, нарастает гипоксия, которая усиливает выработку ангиогенных факторов, как следствие, увеличивается васкуляризация опухоли. Сосудистая сеть опухоли не только обеспечивает снабжение ее клеток питательными веществами и кислородом, но и позволяет опухолевым клеткам попадать в кровотоки и лимфоток. Таким образом, чем больше размеры опухоли и выше плотность ее сосудов, тем выше вероятность возникновения метастазов. Одним из самых убедительных доказательств, связывающих ангиогенез с развитием метастазов, является то, что плотность микрососудов опухоли коррелирует с ее метастатическим потенциалом и неблагоприятным прогнозом почти при всех типах рака [2, 3]. Среди исследуемых в этом контексте генов рассматриваются ангиогенные факторы *VEGFR1/2*, *NRP1*, *FGFR2*. Кроме того, по данным многих исследований, эти факторы принимают участие в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода (ЕМТ) [4-9].

Наряду с генами, активно исследуются роль микроРНК в биохимических путях развития опухоли, а также их значение в процессах метастазирования [10, 11]. Экспрессия генов и микроРНК может являться источником биомаркеров, сигнализирующих о повышенном риске метастазирования. Знание особенностей функционирования таких генов и микроРНК при переходе к диссеминированному состоянию может привести к персонализации терапии и, следовательно, повышению ее эффективности. При этом могут открываться перспективы терапии не только метастатического РЖ, но и более ранних его стадий для предотвращения образования метастазов. Таким об-

разом, выявление генов, ассоциированных с метастазированием, и создание прогностической панели микроРНК и генов, является весьма актуальным. Исходя из данных цитированных выше работ, в настоящее исследование были включены микроРНК *miR-34a* и *miR-335* и гены *FGFR2*, *VEGFR1* и *NRP1*. Были охарактеризованы свойства их экспрессии как биомаркеров метастазирования и найдена оптимальная панель маркеров-кандидатов для прогноза метастазирования.

Материалы и методы

Образцы опухолей РЖ и нормальной ткани того же органа были получены во время хирургических операций или путем биопсии. После забора ткань сразу замораживалась и хранилась при температуре -70°C . В исследование были включены образцы 28 больных с отдаленными метастазами (20 мужчин и 8 женщин) в возрасте от 29 до 87 лет. РЖ без отдаленных метастазов был у 25 пациентов (14 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 39 до 80 лет.

Для выделения РНК использовали наборы *miRNeasy Mini Kit* и *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Германия). Выделение производили согласно инструкции производителя. Этапы выделения РНК включают лизирование ткани, фенольную экстракцию, доочистку на колонке. Дополнительную очистку РНК проводили с помощью набора *RNA Clean-Up and Concentration Kit* (NORGEN). Наличие и качество РНК проверяли, используя электрофорез в 1,8% агарозном геле. Качественными считали образцы РНК, демонстрирующие четкие полосы 18S и 28S РНК без детектируемой электрофоретически примеси ДНК. Концентрацию водного раствора РНК определяли на спектрофотометре *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific, США).

В исследование брали образцы, отвечающие требованиям: концентрация суммарной РНК 50 нг/мкл, отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$) $>1,9$, отношение поглощения на длинах волн 260 и 230 нм ($A_{260/230}$) $>1,8$.

Обратную транскрипцию проводили, используя набор *TaqManTM MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied BiosystemsTM, США) и *ImProm-IITM Reverse Transcriptase* (Promega, США). Количественное определение экспрессии микроРНК осуществляли с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе *Step One Plus* фирмы Applied Biosystems (США). ПЦР-РВ проводили с использованием наборов Applied Biosystems (США) *TaqMan[®] miR-NA Expression Assays* в соответ-

ствии с инструкцией производителя. Использованные наборы:

VEGFA – TagMan Gene Expression Assay Hs 00900055_m1

NRP1 – TagMan Gene Expression Assay Hs00826128_m1

FGFR2 – TagMan Gene Expression Assay Hs01552918_m1

VEGFR1 / *FLT1* – TagMan Gene Expression Assay Hs01052961_m1

VEGFR2 / *KDR* – TagMan Gene Expression Assay Hs00911700_m1

GAPDH – TagMan Gene Expression Assay Hs02786624_g1

TaqMan MicroRNA Assays medium RNU48, Catalog number: 4440887

TaqMan miRNA hsa-miR-34a (ID 000426)

TaqMan miRNA hsa-miR-335 (ID 000546)

В качестве эндогенного контроля использовали РНК U 48 (для микроРНК) и ген *GAPDH* (для генов). Каждое измерение проводили трехкратно.

При статистической обработке результатов с помощью точного критерия Фишера использованы пороги, определенные ROC-анализом. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 10. Значимость раз-

личия медиан определяли с помощью теста Манна–Уитни. Связь экспрессии маркеров с типом опухоли по Lauren и локализацией опухоли определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Уровень значимости для выявленных различий принимали равным менее 0,05.

Результаты и обсуждение

Изучили экспрессию выбранных микроРНК и генов на этапах развития опухолевого процесса с развитием отдаленных метастазов (рис. 1).

Как видно из данных на рис. 1 и приведенных значений медиан в табл. 2, уровень экспрессии miR-34a и miR-335, а также гена *FGFR2* в метастазирующих опухолях относительно не метастазирующих понижается, в то время как уровень экспрессии генов *VEGFR1* и *NRP1* повышается.

Пороги, оптимально дифференцирующие уровни экспрессии микроРНК miR-34a и miR-335, генов *VEGFR1*, *FGFR2* и *NRP1*, при сравнении разных стадий РЖ определяли ROC-анализом (табл. 2). Экспрессия miR-34a и miR-335 и генов *FGFR2*, *VEGFR1* и *NRP1* была ассоциирована с метастазированием в отдаленные от же-

Таблица 1

Клинические данные пациентов

Клинические данные пациентов		всего	ДРЖ	РЖ без отдаленных метастазов
Количество пациентов		53	28	25
пол	мужчины	34	20	14
	женщины	19	8	11
Возраст на момент постановки диагноза медиана (интервал)			55 (29-87)	63 (39-80)
ECOG	0	48	25	23
	1	5	3	2
Локализация опухоли (отделы желудка)	кардиальный	11	8	3
	тело	16	5	11
	антральный/пилорический	15	6	9
	тотальный	11	9	2
Гистологические типы	аденокарцинома	50	26	24
	другие типы	3	2	1
Lauren	кишечный	16	7	9
	диффузный	18	10	8
	смешанный	4	3	1
	нет данных	15	8	7

Примечание: ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) – шкала оценки общего состояния пациента Восточной объединенной онкологической группы.

лудка органы и ткани (диссеминация опухоли), как следует из результатов сравнения медиан и ROC анализа.

Результаты определения связи уровней экспрессии изучаемых генов с диссеминацией опухоли РЖ с помощью точного критерия Фишера представлены в табл. 3.

Наилучшими значениями отношения шансов OR, характеризующими перевес доли маркера в метастазирующих опухолях по отношению к неметастазирующим, имеют miR-335 и гены *VEGFR1* и *NRP1*.

Уровень экспрессии miR-335, также показавшей связь с метастазированием, понижен при многих типах рака, в том числе и при РЖ. Эта микроРНК участвует в регуляции миграции, инвазии, пролиферации и апоптоза опухолевых клеток [12]. miR-335 также относится к ингибиторам EMT и подавляет миграцию и инвазию опухолевых клеток при немелкоклеточном раке легких [13].

Сигнальный путь VEGF считается основным регулятором опухолевого ангиогенеза, и ингибирование этого пути стало стандартной стратегией для лечения многих видов рака. В настоящее время активно исследуется связь сигнального пути VEGF с метастазированием опухоли. В нескольких исследованиях было показано, что *VEGFR 1/2* связаны с развитием отдаленных метастазов. NRPI, как корецептор VEGFR, также задействован в формировании и развитии кровеносных сосудов опухоли и ее метастазировании [14–16].

Кроме того, было показано, что помимо опухолевого ангиогенеза, ангиогенные факторы участвуют в регуляции EMT. EMT – важный процесс, который приводит к увеличению метастатического потенциала опухолевых клеток в результате возникновения у них способностей к инвазии, миграции и устойчивости к апоптозу. По данным Mei B. с соавт., подавление экспрессии

Таблица 2

Ассоциация экспрессии исследуемых генов и микроРНК с отдаленным метастазированием РЖ

МикроРНК и гены	ROC-анализ, значения p	Пороговые уровни экспрессии	Значения медиан экспрессии		Значимость различия медиан, p = (U-test)
			В неметастазирующих опухолях	В метастазирующих опухолях	
miR-34a	0,002	0,4	1,5	0,2	0,001934
miR-335	0.0001	0,3	3,2	0,3	0,000004
<i>NRP1</i>	0.0001	0,97	0,3	1,8	0,000448
<i>VEGFR1</i>	0,0001	0,5	0,2	1,4	0,000024
<i>FGFR2</i>	0.03	0,05	0,1	0,02	0,021537

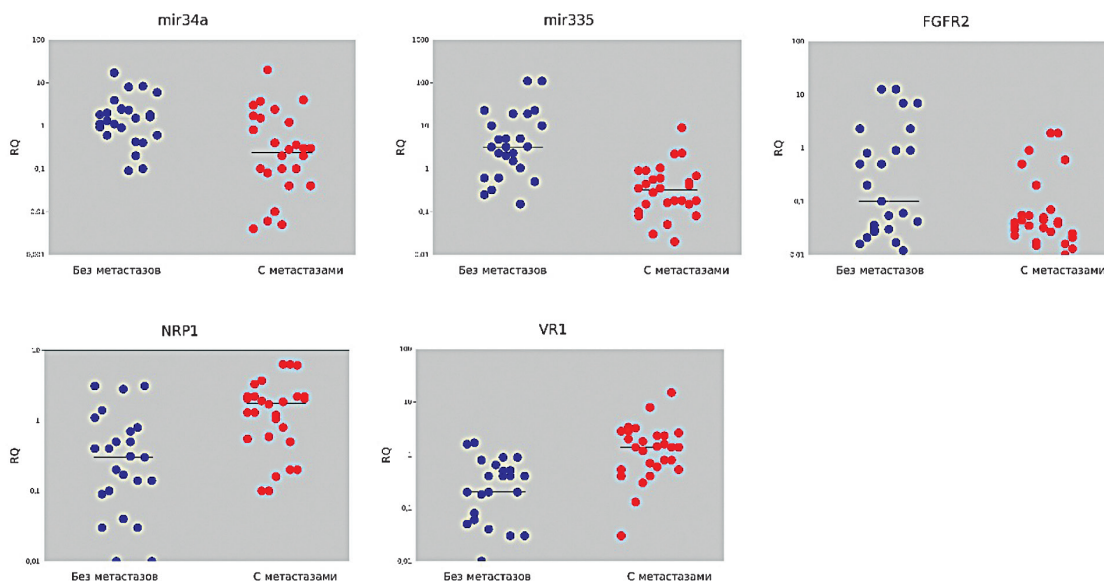


Рис. 1. Результаты измерения экспрессии микроРНК и исследуемых генов в опухолевой ткани относительно нормальной.

генов *VEGFR1/2* и *NRP1*, помимо подавления развития сосудистой сети опухоли, на моделях РЖ ингибировало ЕМТ: отмечалось снижение уровней экспрессии фибронектина, виментина, N-кадгерина и SNAIL и повышение экспрессии Е-кадгерина. Таким образом, подавление экспрессии генов *VEGFR 1/2* и *NRP1* ингибировало рост, миграцию, инвазию, пролиферацию и метастазирование РЖ в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [4].

Экспрессия гена *VEGFR1* в нашем исследовании с высокой значимостью ассоциирована с метастазированием РЖ. Возможно, такая связь обусловлена особенностями структуры белка этого гена, приводящими к запуску процессов миграции клеток. В отличие от *VEGFR2*, который участвует как в физиологическом, так и в патологическом ангиогенезе, *VEGFR1* задействован только в патологическом ангиогенезе. С этим рецептором могут связываться лиганды PIGF, VEGF-A и VEGF-B, с *VEGFR2* может связываться только VEGF-A. Гены *PIGF* и *VEGFR1* гиперэкспрессированы при некоторых типах рака и принимают участие в развитии опухолевого процесса. Кроме того, было обнаружено, что активация *VEGFR1* его лигандом VEGF-B индуцирует ЕМТ, а также приводит к ремоделированию микрососудов опухоли, что способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток. Было показано, что уровень экспрессии *VEGFR1* коррелирует со стадией заболевания при многих типах рака [17]

Нейропиплин 1 (*NRP1*) — трансмембранный гликопротеин, принимающий участие в VEGF-опосредованном ангиогенезе. Он выступает в качестве мно-

гофункционального корцептора, связываясь и модулируя активность различных лигандов и рецепторов, включая *VEGFR1*. Как корцептор, *NRP1* способен принимать участие в метастазировании раковых клеток. Обнаружено, что *NRP1* индуцирует TGF- β 1-опосредованный ЕМТ и способствует развитию метастазов при раке лёгких [18, 19].

FGFR2 также относится к регуляторам ангиогенеза и рассматривается в качестве мишени таргетной терапии. Было показано, что сигнальный путь *FGFR2* активирован в опухолях, резистентных к анти-VEGF терапии. [5] Кроме того, ген *FGFR2* связан с пролиферацией опухолевых клеток и с неблагоприятным прогнозом при РЖ. [6,7] Также было показано, что *FGFR2* является индуктором ЕМТ [8].

Для выявления наилучшей панели кандидатов в маркеры метастазирования были изучены различные комбинации микроРНК и генов (табл. 4). Повышенный или пониженный уровень экспрессии генов и микроРНК определялся порогом, полученным ROC-анализом.

Принцип использования панели состоит в определении уровня экспрессии относительно порогового значения. Если два из трех генов или микроРНК в панели имеют уровни экспрессии выше/ниже порогового значения (в соответствии с изменением экспрессии при метастазировании), то это считается маркером.

Наилучшие показатели, особенно значение отношения шансов OR = 143 и RR = 7,1, имеет панель, включающая miR-335/ *VEGFR1/FGFR2*. Например, ес-

Таблица 3

Характеристики ассоциации уровней экспрессии микроРНК и генов с отдаленным метастазированием РЖ

МикроРНК и гены	Чувствительность, %	Специфичность, %	Критерий Фишера	OR	RR
miR-34a	65	87	0,0025	12	4,8
miR-335	91	73	0,0001	29	3,4
<i>NRP1</i>	61	87	0,006	10	4,5
<i>VEGFR1</i>	78	80	0,0007	14	2,9
<i>FGFR2</i>	78	58	0,02	4,9	1,8

Таблица 4

Панели микроРНК и генов и характеристики их связи с отдаленным метастазированием РЖ

Панель (гены и микроРНК)	Чувствительность, %	Специфичность, %	Критерий Фишера	OR	RR
miR-34a/miR-335/ <i>NRP1</i>	82	84	0,0002	26	5,3
miR-335/ <i>VEGFR1/FGFR2</i>	96	87	0,0000	143	7,1
miR-34a/miR-335/ <i>FGFR2</i>	82	92	0,0000	62	11
miR-34a/miR-335/ <i>VEGFR1</i>	83	75	0,022	14	3,3

Таблица 5

Связь экспрессии маркеров с типом опухоли по Lauren

	F	p
miR-335	3,969096	0,066215
<i>VEGFR1</i>	3,390618	0,086853
<i>FGFR2</i>	3,352987	0,088445

Таблица 6

Связь экспрессии маркеров с локализацией опухоли

	F	p
miR-335	2,142275	0,106873
<i>VEGFR1</i>	0,102359	0,958286
<i>FGFR2</i>	0,793683	0,503305

ли два из трех составляющих ее элементов имеют уровень экспрессии выше (для *VEGFR1*), или ниже (для miR-335 и *FGFR2*) порогового значения, то прогноз неблагоприятный. Вероятность возникновения отдаленных метастазов при РЖ высокая, если значения уровня экспрессии гена *VEGFR1* в образце опухолевой ткани превышает пороговые значения 0,5, относительно нормальной ткани, значение уровня экспрессии мРНК гена *FGFR2* значительно снижено (меньше 0,05), а уровень экспрессии miR-335 менее 0,3. Интересно, что уровни экспрессии miR-34a и *VEGFR2* имеют обратную корреляцию ($R = -0,59$) на регионарной стадии. Такая корреляция отсутствует при диссеминированном РЖ.

МикроРНК miR-34a рассматривается как антиангиогенный фактор. Полученный нами результат указывает на возможность антиангиогенного действия miR-34a путем прямого ингибирования функции гена *VEGFR2*. Снижение экспрессии miR-34a сопровождается увеличением экспрессии *VEGFR2*, способствуя, тем самым, развитию ангиогенеза и прогрессии опухоли к метастатическому состоянию, например, путем активирования сигнального пути MAPK.

Экспрессия исследуемых генов и микроРНК была проверена на возможную связь с другими клиническими характеристиками, такими как тип опухоли и ее локализация (табл. 5, 6).

Из приведенных в табл. 5 и 6 результатов следует отсутствие связи экспрессии исследуемых микроРНК и генов с изученными клиническими показателями.

Заключение

Проведено исследование экспрессии микроРНК miR-34a и miR-335 и генов *VEGFR1*, *FGFR2* и *NRP-1*

при диссеминированном РЖ в сравнении с неметастазирующими опухолями РЖ. Охарактеризована ассоциация экспрессии исследованных генов и микроРНК с развитием отдаленного метастазирования, указывающая на возможность их использования как кандидатов в маркеры. Сформированы панели, включающие гены и микроРНК — кандидаты в маркеры прогноза. Проведенный сравнительный анализ позволил в качестве наиболее эффективной предложить панель, включающую miR-335/*VEGFR1*/*FGFR2*, которая демонстрирует наилучшие показатели при прогнозе метастазирования, особенно значение отношения шансов $OR = 143$ и $RR = 7,1$.

Литература

1. Ina K., Furuta R., Hirade K., Kataoka T., Kabeya M. Long-term survivors of metastatic gastric cancer for >5 years after chemotherapy initiation. *Cancer Rep Rev.* 2019; 3: 5 DOI: 10.15761/CRR.1000183
2. Bielenberg D.R., Zetter B.R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J.* 2015 Jul-Aug;21(4):267-73. doi: 10.1097/PPO.0000000000000138.
3. Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Апанович П.В., Карпукhin А.В. Перспективные гены-мишени таргетной терапии и прогностические биомаркеры рака желудка. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2018;73(4):262-272.
4. Mei B., Chen J., Yang N. *et al.* The regulatory mechanism and biological significance of the Snail-miR590-VEGFR-NRP1 axis in the angiogenesis, growth and metastasis of gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2020; 11: 241. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2428-x>
5. Ichikawa K., Watanabe Miyano S., Minoshima Y. *et al.* Activated FGF2 signaling pathway in tumor vasculature is essential for acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Sci Rep.* 2020; 10: 2939. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59853-z>
6. Kim H.S., Kim J.H., Jang H.J., Han B., Zang D.Y. Pathological and Prognostic Impacts of FGFR2 Overexpression in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *J Cancer.* 2019 Jan 1;10(1):20-27. doi: 10.7150/jca.28204.
7. Wang Y., Shi T., Wang X. *et al.* FGFR2 alteration as a potential therapeutic target in poorly cohesive gastric carcinoma. *J Transl Med.* 2021; 19: 401. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03079-8>
8. Yashiro M., Matsuoka T. Fibroblast growth factor receptor signaling as therapeutic targets in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(8): 2415-2423. DOI: 10.3748/wjg.v22.i8.2415
9. Кипкеева Ф.М., Музаффарова Т.А., Никулин М.П., Апанович П.В., Нерел С.Н., Нариманов М.Н., Малихова О.А., Богуш Т.А., Стилиди И.С., Карпукhin А.В. Ассоциация экспрессии генов основных сигнальных путей развития рака желудка с его метастазированием. *Российский биотерапевтический журнал.* 2018;17(4):106-110.
10. Kipkeeva F., Muzaffarova T., Korotaeva A., Nikulin M., Grishina K., Mansorunov D., Apanovich P., Karpukhin A. MicroRNA in Gastric Cancer Development: Mechanisms and Biomarkers. *Diagnostics* 2020; 10: 891. doi:10.3390/diagnostics10110891.
11. Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Nikulin M.P. *et al.* A Group of miRNA as Candidates for Prognostic Biomarkers of Gastric Cancer Metastasis. *Bull Exp Biol Med.* 2020; 169(1):77-80. doi: 10.1007/s10517-020-04828-3
12. Ye L., Wang F., Wu H., Yang H., Yang Y., Ma Y., Xue A., Zhu J., Chen M., Wang J., Zhang Q.A. Functions and Targets of miR-335 in Cancer.

- Onco Targets Ther. 2021;14:3335-3349 <https://doi.org/10.2147/OTT.S305098>
13. Du W., Tang H., Lei Z. *et al.* miR-335-5p inhibits TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer via ROCK1. *Respir Res* 2019;20: 225. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1184-x>
 14. Nguyen Q.D., Rodrigues S., Rodrigue C.M., Rivat C., Grijelmo C., Bruyneel E., Emami S., Attoub S., Gespach C. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2006 Aug;5(8):2070-7. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0044.
 15. Scartozzi M., Loretelli C., Galizia E., Mandolesi A., Pistelli M., Bittoni A., Giampieri R., Faloppi L., Bianconi M., Del Prete M., Bianchi F., Belvedere L., Bearzi I., Cascinu S. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-R genotyping in guiding the metastatic process in pT4a resected gastric cancer patients. *PLoS One.* 2012;7(7):e38192. doi: 10.1371/journal.pone.0038192.
 16. Sopo M., Anttila M., Hämäläinen K. *et al.* Expression profiles of VEGF-A, VEGF-D and VEGFR1 are higher in distant metastases than in matched primary high grade epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2019;19: 584. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5757-3>
 17. Ceci C., Atzori M.G., Lacal P.M., Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 18;21(4):1388. doi: 10.3390/ijms21041388.
 18. Ding Z., Du W., Lei Z., Zhang Y., Zhu J., Zeng Y., Wang S., Zheng Y., Liu Z., Huang J.A. Neuropilin 1 modulates TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2020 Feb;56(2):531-543. doi: 10.3892/ijo.2019.4938.
 19. Chen Z., Gao H., Dong Z., Shen Y., Wang Z., Wei W., Yi J., Wang R., Wu N., Jin S. NRPI regulates radiation-induced EMT via TGF- β /Smad signaling in lung adenocarcinoma cells. *Int J Radiat Biol.* 2020 Oct;96(10):1281-1295. doi: 10.1080/09553002.2020.1793015.
 20. Meta-Analysis. *J Cancer.* 2019 Jan 1;10(1):20-27. doi: 10.7150/jca.28204.
 21. Wang Y., Shi T., Wang X. *et al.* FGFR2 alteration as a potential therapeutic target in poorly cohesive gastric carcinoma. *J Transl Med.* 2021; 19: 401. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03079-8>
 22. Yashiro M., Matsuoka T. Fibroblast growth factor receptor signaling as therapeutic targets in gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(8): 2415-2423. DOI: 10.3748/wjg.v22.i8.2415
 23. Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Nikulin M.P., Apanovich P.V., Nered S.N., Narimanov M.N., Malekhova O.A., Bogush T.A., Stili-di I.S., Karpukhin A.V. Assotsiatsiya ekspressii genov osnovnykh signal'nykh putey razvitiya raka zheludka s yego metastazirovaniyem [Association of gastric cancer main signaling pathway gene expression with metastasis]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal [Russian Journal of Biotherapy]*. 2018;17(4):106-110. (In Russ.) <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2018-17-4-106-110>
 24. Kipkeeva F., Muzaffarova T., Korotaeva A., Nikulin M., Grishina K., Mansorunov D., Apanovich P., Karpukhin A. MicroRNA in Gastric Cancer Development: Mechanisms and Biomarkers. *Diagnostics* 2020; 10: 891. doi:10.3390/diagnostics10110891.
 25. Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Nikulin M.P. *et al.* A Group of miRNA as Candidates for Prognostic Biomarkers of Gastric Cancer Metastasis. *Bull Exp Biol Med.* 2020; 169(1):77-80. doi: 10.1007/s10517-020-04828-3
 26. Ye L., Wang F., Wu H., Yang H., Yang Y., Ma Y., Xue A., Zhu J., Chen M., Wang J., Zhang Q.A. Functions and Targets of miR-335 in Cancer. *Onco Targets Ther.* 2021;14:3335-3349 <https://doi.org/10.2147/OTT.S305098>
 27. Du W., Tang H., Lei Z. *et al.* miR-335-5p inhibits TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer via ROCK1. *Respir Res* 2019;20: 225. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1184-x>
 28. Nguyen Q.D., Rodrigues S., Rodrigue C.M., Rivat C., Grijelmo C., Bruyneel E., Emami S., Attoub S., Gespach C. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther.* 2006 Aug;5(8):2070-7. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0044.
 29. Scartozzi M., Loretelli C., Galizia E., Mandolesi A., Pistelli M., Bittoni A., Giampieri R., Faloppi L., Bianconi M., Del Prete M., Bianchi F., Belvedere L., Bearzi I., Cascinu S. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-R genotyping in guiding the metastatic process in pT4a resected gastric cancer patients. *PLoS One.* 2012;7(7):e38192. doi: 10.1371/journal.pone.0038192.
 30. Sopo M., Anttila M., Hämäläinen K. *et al.* Expression profiles of VEGF-A, VEGF-D and VEGFR1 are higher in distant metastases than in matched primary high grade epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer* 2019;19: 584. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5757-3>
 31. Ceci C., Atzori M.G., Lacal P.M., Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 18;21(4):1388. doi: 10.3390/ijms21041388.
 32. Ding Z., Du W., Lei Z., Zhang Y., Zhu J., Zeng Y., Wang S., Zheng Y., Liu Z., Huang J.A. Neuropilin 1 modulates TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2020 Feb;56(2):531-543. doi: 10.3892/ijo.2019.4938.
 33. Chen Z., Gao H., Dong Z., Shen Y., Wang Z., Wei W., Yi J., Wang R., Wu N., Jin S. NRPI regulates radiation-induced EMT via TGF- β /Smad signaling in lung adenocarcinoma cells. *Int J Radiat Biol.* 2020 Oct;96(10):1281-1295. doi: 10.1080/09553002.2020.1793015.

References

1. Ina K., Furuta R., Hirade K., Kataoka T., Kabeya M. Long-term survivors of metastatic gastric cancer for >5 years after chemotherapy initiation. *Cancer Rep Rev.* 2019; 3: 5 DOI: 10.15761/CRR.1000183
2. Bielenberg D.R., Zetter B.R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J.* 2015 Jul-Aug;21(4):267-73. doi: 10.1097/PPO.0000000000000138.
3. Kipkeeva F.M., Muzaffarova T.A., Nikulin M.P., *et al.* Perspektivnyye geny-misheni targetnoy terapii i prognosticheskiye biomarkery raka zheludka [Promising targeted therapies genes and prognostic biomarkers of gastric cancer]. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk [Annals of the Russian academy of medical sciences]* 2018; 73(4):262-272. (In Russ.)
4. Mei B., Chen J., Yang N. *et al.* The regulatory mechanism and biological significance of the Snail-miR590-VEGFR-NRPI axis in the angiogenesis, growth and metastasis of gastric cancer. *Cell Death Dis.* 2020; 11: 241. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2428-x>
5. Ichikawa K., Watanabe Miyano S., Minoshima Y. *et al.* Activated FGF2 signaling pathway in tumor vasculature is essential for acquired resistance to anti-VEGF therapy. *Sci Rep.* 2020; 10: 2939. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59853-z>
6. Kim H.S., Kim J.H., Jang H.J., Han B., Zang D.Y. Pathological and Prognostic Impacts of FGFR2 Overexpression in Gastric Cancer: A