

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Кушлинский Н.Е.¹, Уткин Д.О.¹, Логинов В.И.², Филиппова Е.А.², Бурдённый А.М.², Кушлинский Д.Н.³, Пронина И.В.², Брага Э.А.²

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГРУППЫ ГЕНОВ МИКРОРНК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования РФ, 125513, Москва, Россия;

³Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 249036, Обнинск, Россия

Установлено, что доля генов микроРНК, инактивируемых за счет метилирования регуляторных CpG-островков в несколько раз выше, чем генов, кодирующих белки, что повышает их привлекательность как перспективных маркеров онкологических заболеваний. Цель данной работы определить роль клиническую значимость метилирования 13 опухолеассоциированных генов микроРНК (MIR-124a-2, MIR-124a-3, MIR-125-B1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-132, MIR-137, MIR-203a, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) у 26 больных раком яичников. Уровень метилирования оценивали методом метил-специфичной ПЦР в реальном времени. Данные, полученные в первичных опухолях (26), в гистологически неизмененных тканях яичников (15) и в перитонеальных метастазах (19) сопоставляли с применением ряда статистических программ. Для всех 13 генов выявлено нарастание уровня метилирования при переходе от неизменной ткани к первичным опухолям и далее от первичных опухолей к перитонеальным метастазам, причем у генов MIR-203a, MIR-375 и MIR-339 уровень метилирования в метастазах возрастал наиболее существенно (в 2 и более раза). Впервые отмечена корреляция, показывающая согласованность между повышением уровня метилирования в некоторых парах микроРНК, например, MIR-129-2 / MIR-132 ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$), как в первичных опухолях, так и в метастазах. Анализ метилирования генов микроРНК в клинических образцах рака яичников показал связь наблюдаемых молекулярных изменений как с начальными стадиями опухолеобразования, так и с прогрессией и диссеминацией рака яичников, с наличием метастазов в большом сальнике и с появлением асцита. Выявленные зависимости углубляют понимание механизма перитонеального метастазирования и могут быть использованы для отбора новых диагностических и прогностических маркеров рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников; метилирование генов микроРНК.

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Уткин Д.О., Логинов В.И., Филиппова Е.А., Бурдённый А.М., Кушлинский Д.Н., Пронина И.В., Брага Э.А. Клиническая значимость метилирования группы генов микроРНК у больных раком яичников. Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65 (5): 321-327. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-321-327>

Kushlinskii N.E.¹, Utkin D.O.¹, Loginov V.I.², Filippova E.A.², Burdennyu A.M.², Kushlinsky D.N.³, Pronina I.V.², Braga E.A.²

CLINICAL SIGNIFICANCE OF METHYLATION OF A GROUP OF MIRNA GENES IN OVARIAN CANCER PATIENTS

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478, Russian Federation;

²The Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Moscow, 125315, Russian Federation;

³A.F. Tsyb Medical Radiological Scientific Center – branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036, Russian Federation

It was found that the proportion of microRNA genes inactivated by methylation of regulatory CpG islands is several times higher than the genes encoding proteins, which increases their attractiveness as promising markers of cancer. The aim of this work is to evaluate the clinical significance of methylation of 13 tumor-associated microRNA genes (MIR-124a-2, MIR-124a-3, MIR-125-B1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-132, MIR-137, MIR-203a, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) in 26 patients with ovarian cancer. Methylation level was evaluated by the method of methylation-specific PCR in real time. The data obtained in primary tumors (26), histologically unchanged ovarian tissues (15) and peritoneal metastases (19) were compared using a number of statistical programs. For all 13 genes, an increase in the level of methylation was revealed during the transition from unchanged tissue to primary tumors and further from primary tumors to peritoneal metastases; moreover, in the genes MIR-203a, MIR-375 and MIR-339, the level of methylation in metastases increased most significantly (in 2 and more times). A correlation was observed for the first time, showing a consistency between the increase in methylation level in some miRNA pairs, for example, MIR-129-2/MIR-132 ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$), both in primary tumors and in metastases. An analysis of microRNA gene methylation in clinical samples of ovarian cancer showed a correlation between the observed molecular changes both with the

initial stages of tumor formation and with the progression and dissemination of ovarian cancer, with the presence of metastases in a large omentum and with the appearance of ascites. The revealed dependencies deepen the understanding of the mechanism of peritoneal metastasis and can be used to select new diagnostic and prognostic markers of ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; miRNA gene methylation.

For citation: Kushlinskii N.E., Utkin D.O., Loginov V.I., Filippova E.A., Burdennyi A.M., Kushlinsky D.N., Pronina I.V., Braga E.A. Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in patients with ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(5): 321-327 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-321-327>

For correspondence: Kushlinskii Nikolay Evgenievich, Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Kushlinskii N.E. – <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Utkin D.O. – <https://orcid.org/0000-0002-6620-2073>

Loginov V.I. – <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Kushlinsky D.N. – <http://orcid.org/0000-0003-1490-8418>

Burdennyi A.M. – <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Filippova E.A. – <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Pronina I.V. – <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

Braga E.A. – <http://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

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

Acknowledgment. The study of the employees of ²Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, was supported by the state task on the topic No. 0520-2020-0030 «Research on the role of microRNAs, DNA methylation and reprogramming of the immune system cells in oncogenesis».

Received 11.03.2020
Accepted 18.03.2020

Введение. Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация генома, связанная с регуляцией многочисленных процессов в клетке посредством инактивации генов без затрагивания последовательности ДНК. В опухолях наблюдается специфичное гиперметилирование CpG-островков промоторных районов генов-супрессоров опухолевого роста [1]. Метилирование CpG-островков, перекрывающихся с промоторными районами, вовлечено также в подавление экспрессии генов регуляторных микроРНК (miR). Отмечено, что доля генов микроРНК, подверженных метилированию, во много раз больше, чем генов, кодирующих белки [2, 3]. Эта особенность генов микроРНК повышает их привлекательность как перспективных маркеров онкологических заболеваний.

Известно много работ по роли микроРНК и их генов-мишеней в патогенезе и прогрессии рака яичников (РЯ) (см. например, обзоры: 4-6). Однако данные по метилированию генов микроРНК при РЯ ограничены единичными экспериментальными исследованиями [7, 8]; обзорных работ нет.

Материал и методы. Обследовали 26 первичных больных РЯ в возрасте от 27 до 76 лет. У всех пациенток клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования опухоли яичников в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицирован на основании критериев классификации ВОЗ [9]. У всех больных выявлена серозная аденокарцинома яичников. У 17 пациенток выявлена IIIc стадия РЯ, у 5 – Ia, Ib, Ic, у 1 – IIb, у 2 – IIa, у 1 – IIIa стадия.

Молекулярно-генетические исследования проведены в образцах первичных опухолей у 26 больных РЯ, а также в 15 образцах гистологически неизмененных тканей яичников и в 19 образцах перитонеальных метастазов. При этом, для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70-80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3-5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином.

Выделение тотальной ДНК. Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани яичников по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при -20°C. Качество и концентрацию ДНК проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

Анализ метилирования генов микроРНК методом МС-ПЦР с детекцией в реальном времени. Бисульфитную конверсию ДНК проводили, как описано ранее [10], с использованием 0,5-2 мкг ДНК. Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при -20°C и использовали в качестве матрицы при проведении количественной МС-ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов «qPCRmix-HS SYBR» и по протоколу фирмы Евроген. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР генов микроРНК взяты из работ [11-13]. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на не конвертированной ДНК. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (Promega, США). В качестве позитивного контроля 100%-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (Thermo Scientific, США).

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. В качестве параметра уровня метилирования использовали показатель индекса метилирования (ИМ), который рассчитывался по формуле $ИМ = 100 \times (\text{число метилированных копий гена (M)} / (\text{число метилированных копий гена (M)} + \text{число неметилированных копий гена (U)}))$. ИМ представляет собой непрерывное значение от 0 до 1 и может быть интерпретирован как процент метилирования, при этом ИМ=0 представляет полное отсутствие метилирования и ИМ=1 означает полное метилирование гена [14]. Для каждого парного образца был получен индекс метилирования. Достоверность

полученных различий оценивали в программной среде R с применением непараметрических тестов (U-тест Манна-Уитни, критерий типа Колмогорова-Смирнова). U-тест Манна-Уитни используют для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака, что позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Критерий Колмогорова-Смирнова позволяет проверить гипотезу о том, что данные в двух выборках являются частью одного распределения, и также может применяться для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками, однако, обладает меньшей статистической мощностью, чем U-тест Манна-Уитни. Для всех статистических тестов значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных SPSS 20.

Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квартили и применяли непараметрические методы сравнения. Для несвязанных признаков при количестве групп более двух, рассчитывали с применением непараметрического варианта дисперсионного анализа Kruskal-Wallis ANOVA & Median test и Mann-Whitney U test при сопоставлении двух групп. Сравнения связанных значений выполняли с применением непараметрических методов анализа Wilcoxon matched pairs test и Kendall's concordance. Для расчета пороговых значений вычисляли 95% доверительные интервалы показателей. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

При сравнении частот строили таблицы сопряженности признаков. Для расчета p использовали точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий χ^2 .

Проводили корреляционный анализ Spearman для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS.

Результаты и обсуждение. Повышение уровня метилирования группы генов микроРНК у больных РЯ в первичных опухолях и перитонеальных метастазах. В табл. 1 представлены статистические характеристики метилирования генов микроРНК в опухоли, неизменной ткани яичников и в перитонеальных метастазах РЯ.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, медианы уровня метилирования большинства генов микроРНК в неизменной ткани яичников были значимо ниже, чем в первичной опухоли больных РЯ (за исключением *MIR-132*, *MIR-203a* и *MIR-375*; $p > 0,05$), и чем в ткани метастаза (за исключением *MIR-124a-3*, *MIR-132*, *MIR-203a*, *MIR-375*; $p > 0,05$). Однако медианы уровня метилирования указанных в скобках генов микроРНК в неизменной ткани яичников также были минимальными, а в метастазах – наибольшими.

Проведено сравнение уровней метилирования генов микроРНК в тканях перитонеальных метастазов и первичных опухолей. Показано, что медиана уровня метилирования гена *MIR-203a* в тканях метастазов была значимо выше таковой, чем в опухолях (23,3% против 6,8%; $p = 0,027$). Медиана метилирования гена *MIR-375*

в метастазах также была заметно выше таковой, чем в опухоли (27% против 17%; $p = 0,08$ сильная тенденция к различию), так и по сравнению с образцами неизменной ткани яичников (27% против 11,6%; $p = 0,1$). Выявлено, что медиана уровня метилирования гена *MIR-339* также была заметно выше в метастазах по сравнению с первичными опухолями яичников (27,8% против 11,8%; $p = 0,15$).

При сравнении первичных опухолей с неизменной тканью яичников, наибольшие различия уровня метилирования отмечены для генов *MIR-125b-1* ($p = 0,0008$) и *MIR-34b/c* ($p = 0,0008$). У большинства больных РЯ выявлено многократное превышение уровня метилирования гена *MIR-125b-1* в опухоли по сравнению с неизменной тканью яичников. В то же время, метилирование этой микроРНК в перитонеальных метастазах РЯ могло быть как выше, так и ниже, по сравнению с первичными опухолями яичников. Следует отметить, что среди больных РЯ в 73% (19 из 26) наблюдений были выявлены метастазы, что позволяет предполагать ассоциацию гена *MIR-125b-1* с вовлечением первичной опухоли в процесс диссеминации.

Таким образом, у больных РЯ установлено выраженное повышение уровня метилирования практически у всех 13 исследованных генов микроРНК, как в первичной опухоли, так и в метастазах. В метастазах наблюдали дальнейшее повышение метилирования в сравнении с образцами первичных опухолей в 12 из 13 генов (кроме *MIR-124a-2*), причем у генов *MIR-203a*, *MIR-375* и *MIR-339* уровень метилирования в метастазах возрастал в 2 или более раза. Эти данные указывают на связь метилирования генов *MIR-203a*, *MIR-375* и *MIR-339* не столько с развитием первичных опухолей, сколько с процессами диссеминации РЯ, включая эпителиально-мезенхимальный переход, передвижение метастатических клеток и образование вторичного опухолевого очага.

Ко-метилирование, взаимное влияние метилирования одних микроРНК на другие. Проведен анализ корреляционных зависимостей между уровнями метилирования генов микроРНК в опухоли больных РЯ. В табл. 2 представлены только значимые зависимости.

Так, установлена статистически высоко значимая прямая корреляционная зависимость между уровнями метилирования *MIR-129-2* и *MIR-132* ($r_s = 0,72$; $p < 0,0001$). Она означает, что у большей части больных РЯ высоким значениям уровня метилирования одной из выше указанных микроРНК чаще соответствовали высокие значения другой микроРНК и наоборот. Также довольно тесная статистически высоко значимая линейная зависимость в опухоли больных РЯ выявлена между уровнями метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-127* ($r_s = 0,71$; $p < 0,0001$).

В ткани метастазов опухоли больных РЯ выявлены тесные прямые зависимости между *MIR-9-1* и *MIR-34b/c* ($r_s = 0,88$; $p < 0,0001$), а также (как и в первичных опухолях яичников) между *MIR-129a* и *MIR-132* ($r_s = 0,81$; $p < 0,0001$).

Не установлено значимой связи между возрастом больных РЯ и уровнями метилирования всех 13 генов микроРНК, определенных в неизменной ткани яичников, опухоли, а также в тканях метастазов.

Связь метилирования генов микроРНК в тканях больных РЯ с клиническими параметрами заболевания. При анализе результатов исследования уровней метилирования генов микроРНК с учетом стадии РЯ па-

Таблица 1

Уровни метилирования (%) генов микроРНК в опухоли, неизменной ткани яичников и в перитонеальных метастазах больных РЯ

МикроРНК (MIR-) p N-T; p N-mts	Ткань опухоли яичников (n=26)		Неизменная ткань яичников (n=16)		Ткань метастазов (n=19)	
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ
MIR-124a-2 p=0,002; p=0,01;	45,2; 29,0-94,4	0,2-98,1; 2,0-97,5	6,1; 1,1-10,9	0,2-30,0	44,3; 20,4-84,8	11,7-98,8
MIR-124a-3 p=0,01; p>0,05	17,9; 12,8-32,7	3,8-68,2; 8,5-56,8	4,9; 2,7-13,0	1,9-39,1	21,9; 9,4-37,2	1,7-89,1
MIR-125b-1 p=0,001; p=0,008;	38,6; 12,2-81,1	4,0-99,3; 4,8-96,4	4,6; 1,2-13,2	0,1-23,4	44,4; 13,0-67,5	8,0-91,3
MIR-127 p=0,004; p=0,01;	36,9; 20,3-64,8	0,4-93,3; 1,9-88,4	6,1; 1,2-9,1	1,0-28,2	47,3; 26,7-73,4	8,0-92,4
MIR-129-2 p=0,005; p=0,03;	27,0; 15,2-51,2	2,1-80,6; 3,1-62,7	2,9; 1,3-7,8	1,1-19,0	31,4; 21,5-56,1	2,3-83,8
MIR-132 p>0,05; p>0,05	22,0; 4,9-49,3	0,6-98,5; 0,8-91,5	5,7; 2,4-14,9	0,2-92,8	30,0; 4,6-69,1	0,3-99,8
MIR-137 p=0,005; p=0,015;	17,6; 10,7-32,3	1,0-91,0; 1,3-64,4	3,9; 1,5-10,2	0,3-19,9	23,6; 15,2-47,8	0,4-96,8
MIR-203a p>0,05; p>0,05	6,8; 1,9-17,6	0,7-67,4; 0,8-37,6	3,8; 2,3-6,6	0,4-21,4	23,3; 1,6-65,7	0,1-96,1
MIR-34b/c p=0,002; p=0,008;	12,5; 2,0-18,5	0,1-85,3; 0,2-50,2	1,1; 0,1-2,1	0-28,9	15,3; 11,1-54,0	0,1-93,1
MIR-375 p>0,05; p=0,11	15,9; 10,3-23,3	1,0-43,3; 1,8-35,9	2,8; 0,3-20,7	0,1-97,4	27,0; 8,6-45,1	0,4-69,3
MIR-9-1 p=0,0019; p=0,008;	9,2; 7,6-20,8	0,1-90,8; 0,5-75,6	1,5; 0,3-3,1	0-15,1	11,9; 8,9-44,9	1,4-69,3
MIR-9-3 p=0,0008; p=0,008;	20,6; 8,6-45,1	0,4-90,7; 2,3-59,6	4,0; 2,5-5,6	0,1-13,4	25,8; 9,3-33,4	1,8-91,0
MIR-339 p=0,0008; p=0,008;	11,8; 7,5-32,8	3,8-94,4; 3,9-78,3	3,3; 0,9-5,2	0,5-11,8	27,8; 12,8-51,0	5,8-95,6

Таблица 2

Корреляционные зависимости между метилированием микроРНК в ткани первичной опухоли больных РЯ

микроРНК	r _s	p
MIR-124a-2 – MIR-127	0,71	<0,0001
MIR-124a-2 – MIR-129a-2	0,52	0,007
MIR-124a-2 – MIR-34b/c	0,62	0,0007
MIR-124a-2 – MIR-9-1	0,52	0,006
MIR-124a-3 – MIR-137	0,51	0,008
MIR-125b-1 – MIR-9-3	0,55	0,004
MIR-125b-1 – MIR-339	0,64	0,0004
MIR-127 – MIR-129-2	0,57	0,002
MIR-127 – MIR-339	0,58	0,002
MIR-129-2 – MIR-132	0,72	<0,0001
MIR-137 – MIR-203a	0,51	0,008
MIR-34b/c – MIR-9-1	0,64	0,0004
MIR-375 – MIR-9-1	0,5	0,009
MIR-9-1 – MIR-339	0,59	0,0016

Примечание. r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

циентов объединили в 3 группы: 1-я группа – Ia, Ib, Ic стадии (n=5); 2-я группа – IIa, IIb, IIIa стадии (n=4); 3-я группа – IIIc стадии (n=17).

Провели анализ корреляционных зависимостей между уровнями метилирования 13 генов микроРНК в опухоли и стадией РЯ (табл. 3).

Как следует из данных табл. 3, уровень метилирования 8 генов микроРНК в первичной опухоли (MIR-124a-2, MIR-125b-1, MIR-129-2, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) статистически значимо был связан со стадией РЯ прямой корреляционной зависимостью.

Рассчитали статистические характеристики уровня метилирования 13 генов микроРНК у больных РЯ в отношении стадии процесса также методом дисперсионного анализа (табл. 4).

Как следует из данных табл. 4, дисперсионным анализом подтверждено статистически значимое повышение метилирования генов 9 микроРНК в опухоли больных РЯ при увеличении стадии заболевания. При этом можно отметить, что медианы MIR-127 и MIR-9-1 были

Таблица 3

Корреляционные зависимости между уровнем метилирования генов микроРНК в опухоли и стадией РЯ

МикроРНК & Стадия	Опухолевая ткань яичников
MIR-124a-2	$r_s=0,5; p=0,009$
MIR-124a-3	$r_s=-0,05$
MIR-125b-1	$r_s=0,44; p=0,026$
MIR-127	$r_s=0,23$
MIR-129-2	$r_s=0,45; p=0,022$
MIR-132	$r_s=0,09$
MIR-137	$r_s=0,23$
MIR-203a	$r_s=-0,18$
MIR-34b/c	$r_s=0,48; p=0,013$
MIR-375	$r_s=0,43; p=0,027$
MIR-9-1	$r_s=0,49; p=0,01$
MIR-9-3	$r_s=0,5; p=0,009$
MIR-339	$r_s=0,44; p=0,025$

Примечание. r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

наибольшими при II и IIIa стадиях и меньше при IIIc стадиях.

Проведен анализ данных исследования уровней метилирования генов микроРНК в группах больных РЯ с отсутствием и наличием метастазов в большом сальнике (у большинства пациенток (94,4%) размеры метастазов в большом сальнике были размером более 2 см).

Следует отметить, что медианы метилирования большинства изученных генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ были выше у пациенток с метастазами в большом сальнике (за исключением MIR-203a). Из них 6 микроРНК (MIR-124a-2, MIR-129-2, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) статистически значимо отражали наличие метастазов в большом сальнике, еще 2 микроРНК показали сильную тенденцию к различию медиан (MIR-125b-1, MIR-34b/c) (см. рисунок).

Ранее было указано, что у 7 больных РЯ метастазы по брюшине не выявлены, а у 19 пациенток обнаружены метастазы по брюшине размерами <1 см (n=10) и ≥1 см (n=9). Рассчитали статистические характеристики метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ в группах с отсутствием и наличием метастазов по брюшине и их размерами. При этом, только MIR-132, исследованный в первичной опухоли больных РЯ, статистически значимо отражал наличие и размеры метастазов опухоли по брюшине.

Следует также отметить сильную тенденцию к различию медиан метилирования генов MIR-124a-2 и MIR-129-2. Аномальны данные для MIR-125b-1 и MIR-9-3 с высоким уровнем метилирования в опухолях без метастазов. Все эти особенности требуют подтверждения на расширенных выборках образцов. Такой результат может означать, что в период роста вторичной опухоли от 1 до 2 см уровень метилирования большинства генов микроРНК прекращает нарастать и даже снижается. Иными словами молекулярные характеристики генов микроРНК в период роста вторичной опухоли теряют однонаправленный характер изменений, связанный с процессами метастазирования, – образованием метастатических клеток и их миграцией, вплоть до образования и роста вторичного очага.

Не установлено статистически значимой связи метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ с наличием асцита. Однако у больных РЯ с обнаружением асцита наибольшее увеличение медианы метилирования отмечено для гена MIR-124a-2. Так, если в группе из 10 больных без асцита медиана метилирования гена MIR-124a-2 равнялась 29,5; 10,9-93,2%, то в группе из 16 пациенток с асцитом была почти в 2 раза выше и составила 56,0; 35,4-94,4% (p=0,16).

Таким образом, большинство микроРНК в опухоли больных РЯ значимо отражали стадию заболевания: MIR-124a-2, MIR-125b-1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339. Наличие диссеминации опухолевого процесса у больных РЯ отражали следующие микроРНК: MIR-124a-2, MIR-129-2, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339 (опухолевая ткань яичников). Диссеминацию РЯ по брюшине отражал MIR-132 (опухолевая ткань яичников).

Изучили связь уровней метилирования генов микроРНК со степенью дифференцировки опухоли – критерий G (табл. 5). В первичных опухолях яичников чаще выявляли высокие уровни метили-

рования генов микроРНК при низкой степени дифференцировки РЯ – G3, однако только MIR-375 показал статистически значимо различающиеся медианы при умеренной (10,9%) и низкой (21%) степени дифференцировки РЯ. Уровни метилирования генов MIR-9-1 и MIR-9-3 также показали тенденцию к различию медиан при учете степени дифференцировки опухоли.

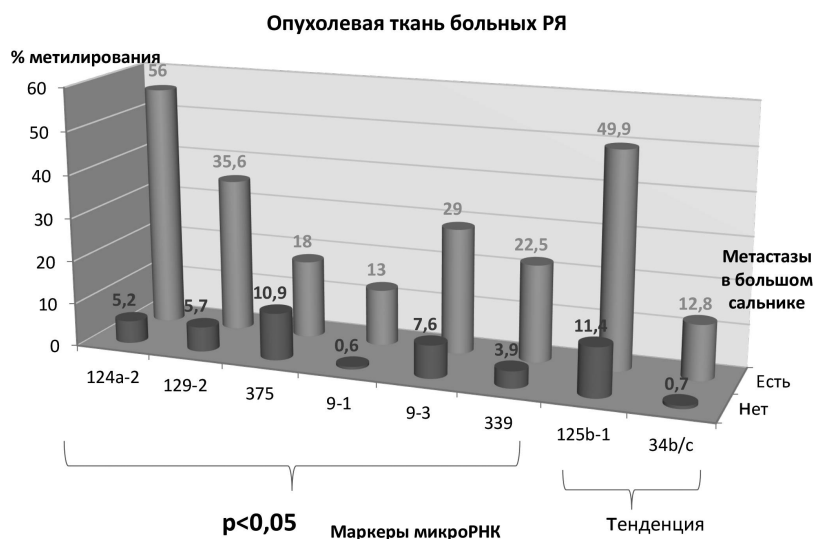
В ткани метастазов, напротив, при G3 степени дифференцировки опухоли чаще выявляли низкие уровни метилирования генов микроРНК. При этом медианы MIR-124a-3 и MIR-339 статистически значимо различались, а MIR-132 показал тенденцию к меньшей медиане.

Заключение. В представленном исследовании изучено метилирование 13 генов микроРНК (MIR-124a-2, MIR-124a-3, MIR-125b-1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-132, MIR-137, MIR-203a, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1,

Таблица 4

Уровни метилирования генов микроРНК в опухоли больных РЯ разных стадий

МикроРНК Ткань опухоли	Обследованные группы			p
	Ia, Ib, Ic (n=5)	IIa, IIb, IIIa (n=4)	IIIc (n=17)	
	Метилирование генов микроРНК (%)			
	Медиана; квартили	Медиана; квартили	Медиана; квартили	
MIR-124a-2	5,0; 2,0-5,2	38,7; 29,5-95,6	56,4; 36,6-94,4	0,004
MIR-124a-3	13,1; 7,2-17,9	27,3; 29,5-31,0	20,2; 12,8-32,7	0,22
MIR-125b-1	8,8; 4,9-11,4	37,7; 23,3-38,6	50,2; 23,1-84,0	0,02
MIR-127	4,8; 3,8-7,9	67,3; 36,4-80,2	37,0; 29,1-61,9	0,014
MIR-129-2	5,6; 3,1-5,7	26,7; 20,3-31,0	36,0; 21,4-51,5	0,036
MIR-132	13,6; 6,3-30,4	16,6; 6,5-36,3	26,9; 3,7-50,0	0,6
MIR-137	7,7; 2,7-9,4	15,7; 14,3-43,6	20,9; 13,5-31,9	0,15
MIR-203a	6,7; 4,0-7,3	20,5; 5,0-35,3	3,3; 1,6-16,6	0,16
MIR-34b/c	0,2; 0,1-1,5	7,7; 0,7-18,1	13,3; 11,3-19,5	0,032
MIR-375	1,8; 1,0-10,9	12,0; 11,0-17,0	18,6; 11,8-26,0	0,06
MIR-9-1	0,6; 0,5-5,6	20,7; 0,6-20,8	13,0; 9,1-21,4	0,007
MIR-9-3	8,6; 2,3-8,7	7,2; 2,7-7,6	38,8; 18,7-50,4	0,045
MIR-339	3,9; 3,8-3,9	21,5; 12,5-26,5	22,5; 7,9-43,8	0,009



Медианы метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ в зависимости от наличия метастазов в большом сальнике.

Таблица 5

Уровни метилирования генов микроРНК в опухоли и метастазах с учетом степени дифференцировки РЯ

МикроРНК	Метилирование генов микроРНК, %					
	Медиана; квартили					
	Опухолевая ткань яичников			Ткань метастазов		
	G2 (n=11)	G3 (n=13)	p	G2 (n=7)	G3 (n=12)	p
MIR-124a-2	38,7; 5,2-96,4	47,5; 35,8-63,3	>0,05	50,8; 40,2-90,4	33,9; 19,9-66,6	>0,05
MIR-124a-3	20,2; 13,1-40	15,6; 12,8-30,3	>0,05	36,9; 18,5-68,9	13,6; 7,7-32,6	0,045
MIR-125b-1	37,7; 8,8-81,1	49,9; 23,1-82,7	>0,05	44,0; 13,0-85,7	44,4; 11,8-66,3	>0,05
MIR-127	50,4; 4,8-76,4	36,9; 24-51,1	>0,05	46,9; 24,7-74,9	47,3; 26,7-68,6	>0,05
MIR-129-2	27,0; 5,7-51,5	27,0; 18,5-50,2	>0,05	54,8; 28,7-82,9	27,1; 17,8-34,9	>0,05
MIR-132	16,6; 6,5-37,7	36,3; 1,9-50,0	>0,05	63,7; 30,0-71,6	9,1; 1,7-30,2	0,14
MIR-137	14,3; 2,9-43,6	20,9; 16,2-24,9	>0,05	19,3; 8,7-53,9	23,6; 15,2-39,3	>0,05
MIR-203a	6,8; 3,3-20,5	3,3; 1,6-16,6	>0,05	56,3; 2,7-76,3	4,6; 0,5-27,3	>0,05
MIR-34b/c	7,7; 0,7-23,5	12,8; 11,3-16,3	>0,05	20,1; 3,4-54,0	12,9; 11,1-50,3	>0,05
MIR-375	10,9; 3,3-17,0	21,0; 15,9-27,1	0,004	26,9; 4,7-43,2	27,0; 8,8-45,1	>0,05
MIR-9-1	9,1; 0,6-20,7	20,0; 9,1-21,4	0,16	20,1; 8,9-44,9	11,1; 5,6-24,9	>0,05
MIR-9-3	8,7; 17,2-39,7	38,8; 18,4-52,5	0,11	13,5; 9,2-34,4	25,8; 9,3-28,6	>0,05
MIR-339	11,8; 3,9-26,5	22,5; 7,9-32,8	>0,05	45,6; 29,5-56,1	16,7; 8,8-22,8	0,036

Примечание. Статистически значимые достоверности выделены жирным шрифтом.

MIR-9-3, MIR-339), содержащих CpG-островки, в 26 первичных опухолях больных РЯ, в 15 образцах гистологически неизмененных тканей яичников и в 19 образцах перитонеальных метастазов. Для всех 13 генов выявлено нарастание уровня метилирования при переходе от неизменной ткани к первичным опухолям и далее от первичных опухолей к перитонеальным метастадам, причем у генов MIR-203a, MIR-375 и MIR-339 уровень метилирования в метастазах возрастал наиболее существенно – в 2 или более раза. Можно предположить, что метилирование генов MIR-203a, MIR-375 и MIR-339 связано не столько с развитием первичных новообразований, сколько с процессами диссеминации РЯ, включая эпителиально-мезенхимальный переход, передвижение опухолевых клеток и образование вторичного метастатического опухолевого очага. Впервые отмечена корреляция, показывающая согласованность между повы-

шением уровня метилирования для нескольких пар микроРНК. Наиболее значимая согласованность выявлена для двух пар генов: MIR-124-2 / MIR-127 и MIR-129-2 / MIR-132 ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$) в первичных опухолях и еще для ряда пар в метастазах. Ранее участие 13 исследованных микроРНК в патогенезе РЯ было показано, главным образом, в функциональных исследованиях на клеточных культурах [см. например, 15-20]. Однако, анализ метилирования генов микроРНК в клинических образцах РЯ, показывает связь этих молекулярных изменений как с начальными стадиями опухолеобразования, так и с прогрессией и диссеминацией РЯ, с наличием метастазов в большом сальнике и с появлением асцита. Полученные нами результаты углубляют наше понимание механизма перитонеального метастазирования и могут быть использованы для отбора новых диагностических и прогностических маркеров.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование сотрудников ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования РФ выполнено при поддержке государственными заданием по теме № 0520-2020-0030 «Исследование роли микроРНК, метилирования ДНК и перепрограммирования клеток иммунной системы в онкогенезе».

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-20 см. REFERENCES)

4. Брага Э.А., Фридман М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК. *Биохимия*. 2017; 82 (5): 717-31.

REFERENCES

1. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13(7):484-92.
2. Kunej T., Godnic I., Ferdin J., Horvat S., Dovc P., Calin G.A. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat. Res.* 2011; 717(1-2):77-84.
3. Piletic K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch. Toxicol.* 2016; 90(10):2405-19.
4. Braga E.A., Fridman M.V., Kushlinskii N.E. Molecular Mechanisms of Ovarian Carcinoma Metastasis: Key Genes and Regulatory MicroRNAs. *Biokhimiya*. 2017; 82(5):717-3. (in Russian)
5. Deb B., Uddin A., Chakraborty S. miRNAs and ovarian cancer: An overview. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233(5):3846-54.
6. Staicu C.E., Predescu D.V., Rusu C.M., Radu B.M., Cretoiu D., Suciu N., Cretoiu S.M., Voinea S.C. Role of microRNAs as Clinical Cancer Biomarkers for Ovarian Cancer: A Short Overview. *Cells*. 2020; 9(1):E169.
7. Schmid G., Notaro S., Reimer D., Abdel-Azim S., Duggan-Peer M., Holly J., Fiegl H. et al. Expression and promotor hypermethylation of miR-34a in the various histological subtypes of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2016; 16:102.
8. Deng Y., Zhao F., Hui L., Li X., Zhang D., Lin W., Chen Z., Ning Y. Suppressing miR-199a-3p by promoter methylation contributes to tumor aggressiveness and cisplatin resistance of ovarian cancer through promoting DDR1 expression. *J. Ovarian Res.* 2017; 10(1):50.
9. Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H., eds. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. (4th ed.). Lyon: IARC; 2014.
10. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Gerashchenko

G.V., Chashchina L.I., Kazubskaya T.P., Kondratieva T.T., Lerman M.I., Angeloni D., Braga E.A., Kashuba V.I. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers. *PLoS One*. 2015; 10:e0123369.

11. Braga E.A., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Kurevlev S.V., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Ermilova V.D., Kushlinskii N.E. Five Hypermethylated MicroRNA Genes as Potential Markers of Ovarian Cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 164(3):351-5.
12. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. 2017; 604:1-8.
13. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyi A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Khodyrev D.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene*. 2018; 662:28-36.
14. van Hoesel A.Q., Sato Y., Elashoff D.A., Turner R.R., Giuliano A.E., Shamonki J.M., Kuppen P.J., van de Velde C.J., Hoon D.S. Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *Br. J. Cancer*. 2013; 108(10):2033-8.
15. Kim Y.W., Kim E.Y., Jeon D., Liu J.L., Kim H.S., Choi J.W., Ahn W.S. Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* 2014; 8:293-314.
16. Yuan L., Li S., Zhou Q., Wang D., Zou D., Shu J., Huang Y. MiR-124 inhibits invasion and induces apoptosis of ovarian cancer cells by targeting programmed cell death 6. *Oncol. Lett.* 2017; 14(6):7311-7.
17. Bi L., Yang Q., Yuan J., Miao Q., Duan L., Li F., Wang S. MicroRNA-127-3p acts as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer by regulating the BAG5 gene. *Oncol. Rep.* 2016; 36(5):2563-70.
18. Wang J., Ye C., Liu J., Hu Y. UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian cancer through miR-129/ABC1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 501(4):1034-40.
19. Sun J., Cai X., Yung M.M., Zhou W., Li J., Zhang Y. et al. miR-137 mediates the functional link between c-Myc and EZH2 that regulates cisplatin resistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2019; 38(4):564-80.
20. Liu H.Y., Zhang Y.Y., Zhu B.L., Feng F.Z., Zhang H.T., Yan H., Zhou B. MiR-203a-3p regulates the biological behaviors of ovarian cancer cells through mediating the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway by targeting ATM. *J. Ovarian Res.* 2019; 12(1):60.

Поступила 11.03.20
Принята к печати 18.03.20