

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Брага Э.А.^{1,2}, Пронина И.В.¹, Филиппова Е.А.¹, Бурденный А.М.¹, Лукина С.С.¹, Логинов В.И.^{1,2}, Кушлинский Д.Н.³, Казубская Т.П.³, Уткин Д.О.³, Жордания К.И.³, Кушлинский Н.Е.³

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ И ЭКСПРЕССИИ ГРУППЫ ГЕНОВ МИКРОРНК В ОПУХОЛЯХ БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 123315, Москва, Россия;

²ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, 115478, Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

Рак яичников характеризуется бессимптомным течением вплоть до терминальных стадий с развитием обширного метастазирования. Цель настоящей работы – определить потенциальные маркеры диагностики и прогноза метастатического рака яичников на основе анализа метилирования и экспрессии 21 гена микроРНК на представительной выборке первичных опухолей и метастазов 138 пациентов, включая 66 опухолей без метастазов, 72 опухоли от пациентов с метастазами и 30 перитонеальных макроскопических метастазов. С применением методов количественной метил-специфичной ПЦР установлено гиперметилирование 16 генов микроРНК и снижение уровня метилирования гена MIR-191 ($p < 0,001$). С применением ОТ-ПЦР в реальном времени на выборке из 59 образцов первичных опухолей показано снижение уровней экспрессии 10 микроРНК: miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-137-3p, miR-148a-3p, miR-193a-5p, miR-212-3p, miR-219a-5p и miR-339-3p и повышение уровней экспрессии miR-203a-3p и miR-375-3p ($p \leq 0,001$). Установлена связь уровня метилирования 12 генов микроРНК с более поздними стадиями рака, трех генов (MIR-129-2, MIR-9-1, MIR-9-3) со снижением дифференцировки, и 8 генов (MIR-107, MIR-124-2, MIR-125-B1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-130B, MIR-137, MIR-193A) – с наличием метастазов у пациентов ($p \leq 0,001$). Обнаружено значительное повышение уровня метилирования MIR-148A в 30 перитонеальных макроскопических метастазах относительно первичных опухолей от 72 больных с метастазами ($p < 0,001$). Интересно, что в первичных опухолях больных, как с метастазами, так и без метастазов, метилирование MIR-148A выявлено не было. В итоге, на основе показателей метилирования и экспрессии генов микроРНК определено до 17 потенциальных диагностических маркеров рака яичников, 8 потенциальных маркеров метастатического рака и один маркер (MIR-148A), специфичный для метастазов в брюшной полости, что может найти применение в клинике.

Ключевые слова: рак яичников; метастазирование; гены микроРНК; метилирование.

Для цитирования: Брага Э.А., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Лукина С.С., Логинов В.И., Кушлинский Д.Н., Казубская Т.П., Уткин Д.О., Жордания К.И., Кушлинский Н.Е. Функциональная и клиническая значимость метилирования и экспрессии группы генов микроРНК в опухолях больных метастатическим раком яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (1): 56-64. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-1-56-64>

Для корреспонденции: Бурденный Алексей Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики; e-mail: burdennyu@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств Российского Научного Фонда, грант № 20-15-00368.

Поступила 14.11.2022

Принята к печати 22.11.2022

Опубликовано 20.01.2023

Braga E.A.^{1,2}, Pronina I.V.¹, Filippova E.A.¹, Burdennyu A.M.¹, Lukina S.S.¹, Loginov V.I.^{1,2}, Kushlinsky D.N.³, Kazubskaya T.P.³, Utkin D.O.³, Zhordania K.I.³, Kushlinskii N.E.³

FUNCTIONAL AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE MIRNA GENE GROUP METHYLATION AND EXPRESSION IN TUMORS FROM PATIENTS WITH METASTATIC OVARIAN CANCER

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russia;

²Research Centre for Medical Genetics, 115478, Moscow, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115522, Moscow, Russia

Ovarian cancer is characterized by an asymptomatic course up to the terminal stages with the development of extensive metastasis. The aim of this work is to identify potential markers for the metastatic ovarian cancer diagnosis and prognosis based on the analysis of 21 miRNA genes methylation and expression using a representative samples set of primary tumors and metastases from 138 patients, including 66 tumors without metastases, 72 tumors from patients with metastases and 30 peritoneal macroscopic metastases. Using the methods of quantitative methylation-specific PCR, hypermethylation of 16 miRNA genes and a decrease in the level of methylation of the MIR-191 gene ($p < 0,001$) were established. Using real-time RT-PCR, on set of 59 primary tumor samples it was shown a decrease in the expression levels of 10 miRNAs: miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-137-3p, miR-148a-3p, miR-193a-5p, miR-212-3p, miR-219a-5p and miR-339-3p and increased expression levels of miR-

203a-3p and miR-375-3p ($p \leq 0,001$). The methylation level of 12 miRNA genes was associated with later stages of cancer; three genes (MIR-129-2, MIR-9-1, MIR-9-3) with a decrease in differentiation, and 8 genes (MIR-107, MIR-124-2, MIR-125-B1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-130B, MIR-137, MIR-193A) - with the presence of metastases in patients ($p \leq 0,001$). A high increase in the level of MIR-148A methylation was found in 30 peritoneal macroscopic metastases compared with the primary tumors from 72 patients with metastases ($p < 0,001$). Interestingly, methylation of MIR-148A was not detected in primary tumors from patients with or without metastases. As a result, based on methylation and miRNA gene expression, we identified up to 17 potential diagnostic markers of ovarian cancer; 8 potential markers of metastatic cancer; and one marker (MIR-148A) specific for metastases in the peritoneum, which can be used in the clinical practice.

Key words: ovarian cancer; metastasis; miRNA genes; methylation.

For citation: Braga E.A., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Loginov V.I., Kushlinsky D.N., Kazubskaya T.P., Utkin D.O., Zhordania K.I., Kushlinskii N.E. Functional and clinical significance of miRNA genes group methylation and expression in tumors from patients with metastatic ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (1): 56-64 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-1-56-64>

For correspondence: Burdenny Alexey Mikhailovich, PhD, Leading Researcher, Pathogenomics and Transcriptomics Laboratory; e-mail: burdenny@gmail.com

Information about authors:

Braga E.A., <http://orcid.org/0000-0001-5188-4094>;
Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>;
Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>;
Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>;
Lukina S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>;
Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>;
Kushlinsky D.N., <https://orcid.org/0000-0003-1490-8418>;
Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>;
Utkin D.O., <https://orcid.org/0000-0002-6620-2073>;
Zhordania K.I., <https://orcid.org/0000-0001-7931-2338>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

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

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 20-15-00368.

Received 14.11.2022
Accepted 22.11.2022
Published 20.01.2023

Введение. Рак яичников (РЯ) развивается бессимптомно вплоть до терминальных стадий и в итоге по смертности занимает первое место среди онкогинекологических заболеваний в мире [1]. Обширное метастазирование при РЯ обусловлено, по-видимому, тем, что имплантационные метастазы, в основном, распространяются по брюшине, что не требует от опухолевых клеток процессов интравазации и экстравазации. Хотя гематогенное и лимфогенное метастазирование также свойственно РЯ, но перитонеальный карциноматоз доминирует в клинике заболевания [2]. Метастатические клетки циркулируют в перитонеальной жидкости, что в итоге приводит к постепенному формированию асцита, который, наряду с опухолевыми клетками содержит иммунные и эндотелиальные клетки, а также фибробласты [3]. Все это создает уникальное микроокружение, способствующее прогрессии РЯ, подавлению иммунной системы и развитию устойчивости к химиотерапии. Преобладание перитонеального метастазирования, в отличие от характерных для большинства видов опухолей гематогенного и лимфогенного, обуславливает более агрессивный характер метастатического РЯ [4]. В итоге, несмотря на достижения в циторедуктивной хирургии, химиотерапии, таргетной и иммунотерапии у многих пациентов в течение 12-18 месяцев возникает рецидив. Следовательно, необходимо разработать альтернативные методы своевременной диагностики, выявить новые мишени лекарственной терапии и маркеры ответа на лечение и оценки прогноза РЯ.

Отмечено, что экспрессия генов микроРНК (миРНК), как и белок-кодирующих генов, может подавляться гиперметилованием промоторных CpG-островков, и что процент генов, deregulированных aberrantным метилированием, значительно выше среди генов миРНК, чем среди генов, кодирующих белки [5]. Ранее клиническая значимость метилирования генов миРНК для больных РЯ была выявлена при анализе 13 генов миРНК в опухолях больных РЯ [6]. Цель настоящей работы – определить новые потенциальные маркеры в диагностике и оценке прогноза метастатического РЯ в результате анализа метилирования и экспрессии 21 гена миРНК на представительной выборке первичных опухолей и макроскопических метастазов.

Материал и методы. Исследование включало 138 образцов злокачественных эпителиальных опухолей яичников, из которых 66 образцов от пациентов без метастазов и 72 – от пациентов с метастазами, а также 30 перитонеальных макроскопических метастазов, собранных и охарактеризованных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Пациенты до операции не получали химиотерапевтического и лучевого лечения. Используемые в исследовании опухоли классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза, а также гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [7]. Клинико-патоморфологические характеристики 138 образцов опухолей, использованных в данной рабо-

те, приведены в таблице. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике. Уровень метилирования генов миРНК анализировали методом количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени по методу, опубликованному ранее [8]. Праймеры взяты из работы [8]. Амплификацию проводили с использованием набора реактивов «qPCRmix-HS SYBR» согласно протоколу фирмы Eurogen в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса *ACTB* с использованием олигонуклеотидов специфичных к не конвертированной матрице. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве положительного контроля 100% метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”).

Анализ уровня 20 миРНК выполнен с использованием наборов TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems): miR-124-3p (assay ID: 001182), miR-125b-5p (assay ID: 000449), miR-127-5p (assay ID: 002229), miR-129-5p (assay ID: 000590), miR-132-3p (assay ID: 000457), miR-137-3p (assay ID: 001129), miR-148a-3p (assay ID: 00470), miR-17-5p (assay ID: 002308), miR-191-5p (assay ID: 002299), miR-193a-5p (assay ID: 002281), miR-203a-3p (assay ID: 000507),

miR-212-3p (assay ID: 000515), miR-219a-5p (assay ID: 000522), miR-24-2-5p (assay ID: 002441), miR-339-3p (assay ID: 002184), miR-34a-5p (assay ID: 000426), miR-34b-3p (assay ID: 002102), miR-34c-3p (assay ID: 241009_mat), miR-375-3p (assay ID: 000564) и miR-9-5p (assay ID: 000583). Уровни экспрессии RNU48 (assay ID: 001006) и RNU6 (assay ID: 001093) использованы в качестве контроля. Исследовано 59 парных образцов РЯ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22, включая определение медианы (Me) и межквартильного размаха (Q1-Q3). Для оценки достоверности различий применяли непараметрический критерий Манна—Уитни. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (r) и уровень его значимости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Применяли поправку на множественное сравнение Бенджамини—Хохберга и оценивали величину FDR (False Discovery Rate, частота ложного обнаружения). Статистическую оценку данных по изменению уровня метилирования генов миРНК проводили с применением показателя индекса метилирования (ИМ), рассчитанного для каждого образца.

Результаты и обсуждение. Проведен сравнительный анализ уровня метилирования 21 гена миРНК (*MIR-107*, *MIR-124-1/-2/-3*, *MIR-125-B1*, *MIR-1258*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-130B*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-148A*, *MIR-191*, *MIR-193A*, *MIR-203A*, *MIR-212*, *MIR-339*, *MIR-34B/C*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) в 138 образцах первичных опухолей яичников и 119 парных образцах гистологически неизменной прилегающей ткани яичников. На рис. 1, а, б представлена тепловая карта, отражающая изменения уровней метилирования всех 21 генов миРНК в опухолях относительно нормы. Для 16 генов миРНК (за исключением пяти генов *MIR-148A*, *MIR-191*, *MIR-203A*, *MIR-212*, *MIR-375*) установлено высоко статистически значимое ($p < 0,001$, FDR=0,01) увеличение уровня метилирования, а для гена *MIR-191* выявлено высоко значимое ($p < 0,001$, FDR=0,01) снижение уровня метилирования в образцах РЯ по сравнению с парными образцами гистологически неизменной прилегающей ткани.

Полученные данные указывают на высоко значимую связь метилирования 17 генов миРНК (*MIR-107*, *MIR-124-1/-2/-3*, *MIR-125-B1*, *MIR-1258*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-130B*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-191*, *MIR-193A*, *MIR-339*, *MIR-34B/C*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) с патогенезом РЯ. Чтобы подтвердить функциональную значимость данных по изменению статуса метилирования исследованных генов миРНК, мы провели количественный анализ изменения уровней экспрессии кодируемых ими миРНК на общей выборке из 59 парных образцов РЯ. Высоко значимо ($p \leq 0,001$, FDR=0,01) сниженная экспрессия в опухолях показана для 10 миРНК: miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-137-3p, miR-148a-3p, miR-193a-5p, miR-212-3p, miR-219a-5p и miR-339-3p (рис. 2).

Клинико-морфологическая характеристика опухолей больных раком яичников

Клинико-морфологическая характеристика опухолей	Гистологический тип опухоли	Количество образцов
		Серозная
	Эндометриодная	18
	Смешанная	9
	Пограничная	7
	Муцинозная	5
	Светлоклеточная	4
	Недифференцированная	1
Стадия	I	20
	II	23
	III	89
	IV	6
Размер опухоли	T1	21
	T2	26
	T3	91
Наличие метастазов	Не выявлены	66
	Выявлены	72
Степень дифференцировки опухоли	G1	18
	G2	41
	G3	71
	G4	1

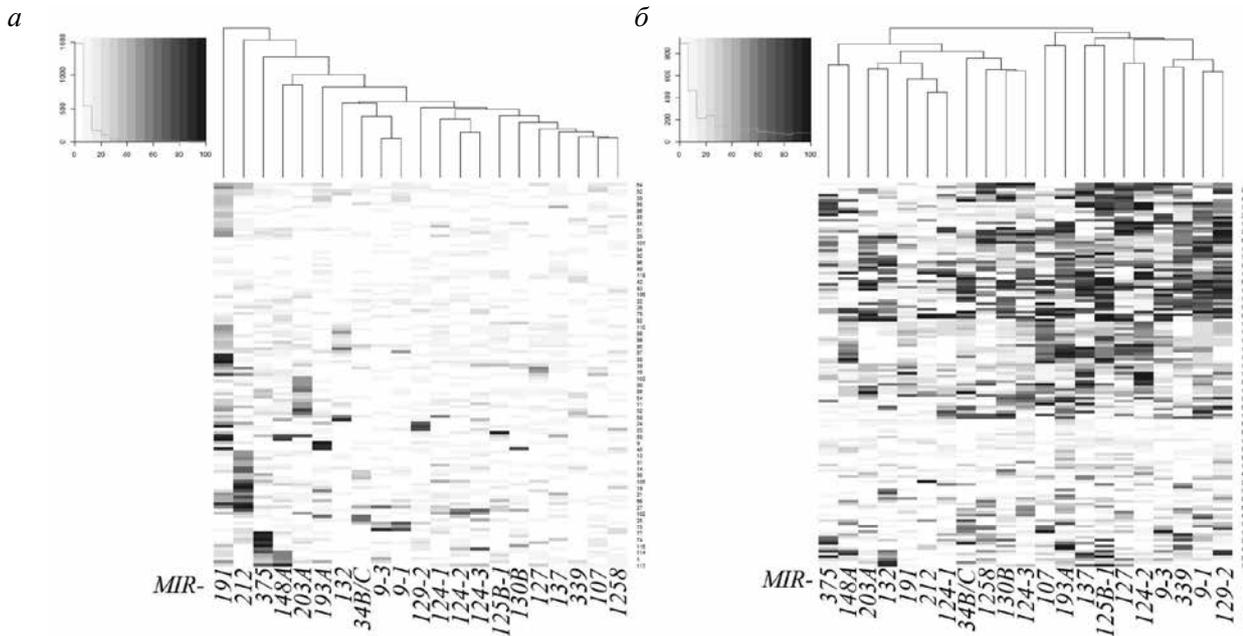


Рис. 1. Данные по изменению уровня метилирования 21 гена миРНК в 138 злокачественных первичных опухолях яичников относительно прилежащей гистологически нормальной ткани, представленные в виде тепловой карты. *а* – данные для 119 образцов нормы; *б* – данные для 138 образцов опухолей.

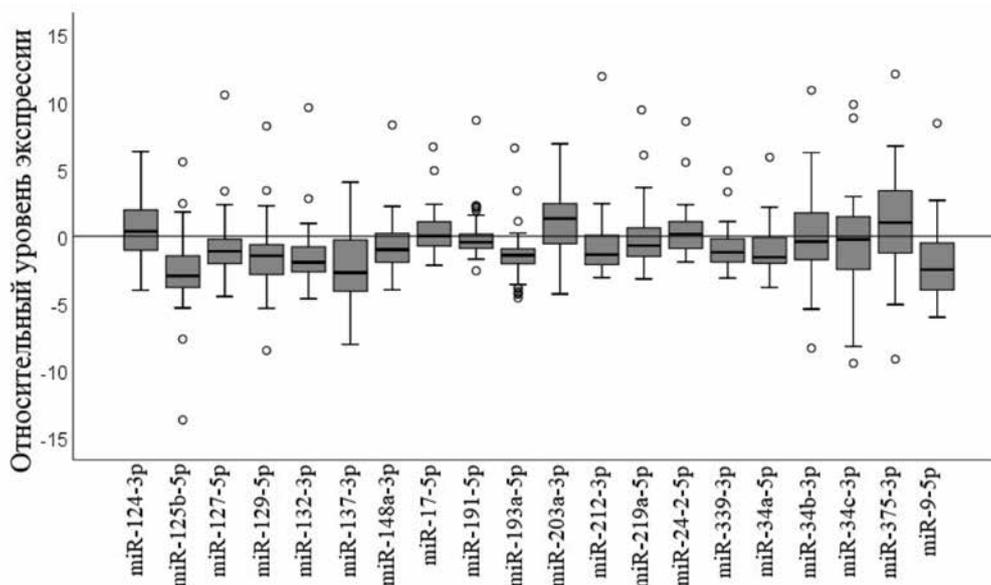


Рис. 2. Профиль экспрессии 20 миРНК при анализе 59 парных образцов рака яичников.

Высоко значимо ($p < 0,001$, $FDR = 0,01$) повышенную экспрессию проявили две миРНК miR-203a-3p и miR-375-3p (рис. 2). Выявленное снижение экспрессии 7 миРНК (miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-137-3p, miR-193a-5p, miR-339-3p), по крайней мере, частично обусловленное гиперметилированием кодирующих их генов, позволяет предполагать супрессорные функции данных миРНК. На примере четырех генов (*MIR-124-3*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*) установлена статистически значимая корреляция ($r_s = -0,3$ до $-0,6$, $p < 0,02$, $FDR = 0,05$) между изменениями уровней метилирования и экспрессии на общей выборке из 59 парных образцов РЯ (рис.

3, *а-г*). Эти данные подтверждают функциональную роль метилирования генов миРНК в подавлении их экспрессии.

Данные по изменениям уровней метилирования 21 гена миРНК сопоставлены с параметрами прогрессии РЯ: с более запущенными клиническими стадиями, с повышением степени злокачественности и с появлением метастазов у больных РЯ. Как видно на рис 4, *а*, высоко значимая связь ($p < 0,001$, $FDR = 0,01$) со стадией (III-IV против I-II) установлена для 12 генов миРНК: *MIR-107*, *MIR-124-2*, *MIR-125B-1*, *MIR-1258*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-130B*, *MIR-137*, *MIR-339*, *MIR-34B/C*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*. Однако, со снижением

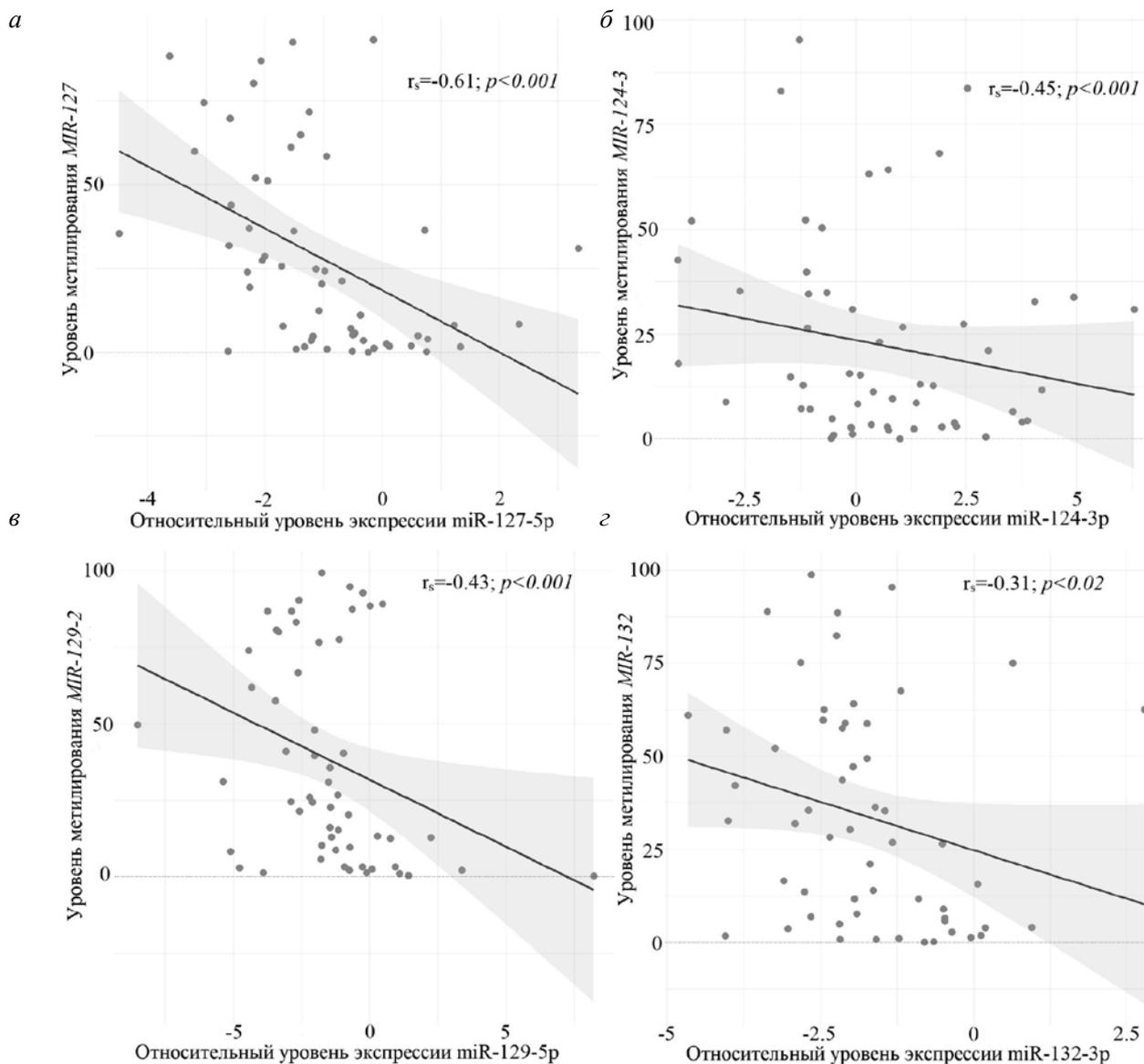


Рис. 3. Статистически значимая корреляция между изменениями уровней метилирования и экспрессии генов *MIR-127* (а), *MIR-124-3* (б), *MIR-129-2* (в) и *MIR-132* (г), исследованных на общей группе из 59 парных образцов рака яичников.

степени дифференцировки ассоциировано гиперметилирование только трех генов (*MIR-129-2*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) ($p<0,001$, FDR=0,01) (рис. 4, б).

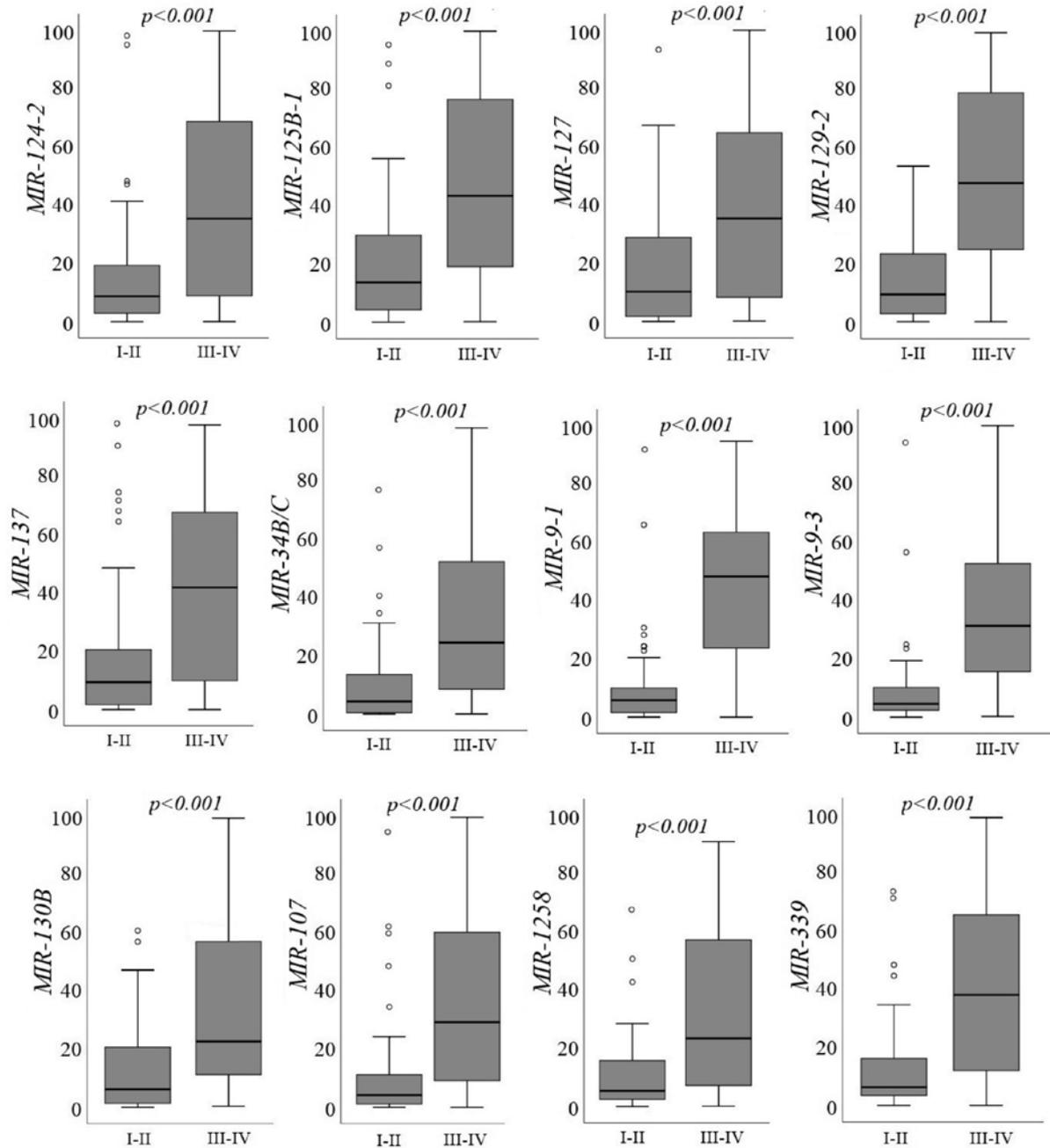
Сравнение уровней метилирования 21 гена миРНК в первичных опухолях больных РЯ без метастазов и с метастазами представлено на рис. 5, а, б в виде тепловой карты.

Как видно на рис. 5, уровень метилирования многих генов миРНК в первичных опухолях повышается после появления метастазов у больных. Оценка достоверности различий с применением критерия Манна—Уитни показала, что 8 генов миРНК (*MIR-107*, *MIR-124-2*, *MIR-125-B1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-130B*, *MIR-137*, *MIR-193A*) высоко значимо ($p<0,001$, FDR=0,01) повышают уровень метилирования в первичных опухолях после начала метастазирования. Интересно отметить, что при сравнении 12 генов миРНК, ассоциированных с более тяжелыми стадия-

ми, и 8 генов, связанных с началом метастазирования, определены 7 совпадающих генов: *MIR-107*, *MIR-124-2*, *MIR-125-B1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-130B*, *MIR-137*. Таким образом, эти процессы могут иметь общие факторы инициации в отличие от остальных процессов, ассоциированных с прогрессией РЯ.

Проведено сравнение уровней метилирования всех генов миРНК в 72 образцах первичных опухолей от пациентов с метастазами и в 30 образцах перитонеальных макроскопических метастазов. Относительно первичных опухолей от пациентов с метастазами, в перитонеальных макрометастазах обнаружено высоко значимое повышение уровня метилирования гена *MIR-148A* ($p<0,001$, FDR=0,01). Кроме того, показано повышение метилирования гена *MIR-127* и снижение уровней метилирования *MIR-129-2* и *MIR-9-1* ($p<0,05$, FDR=0,05) (рис. 6).

a



b

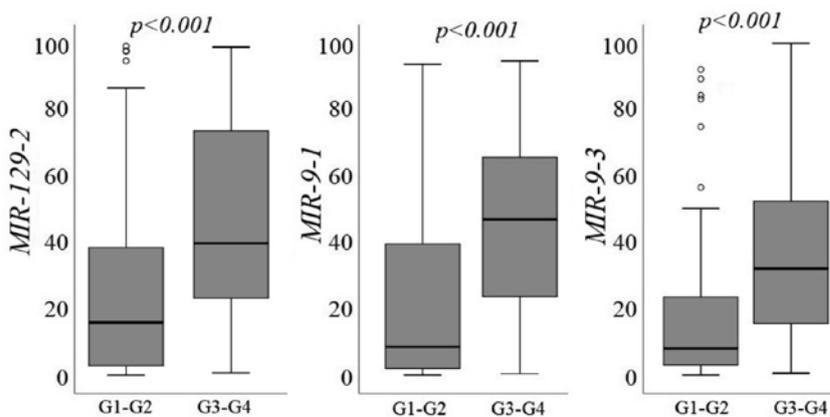


Рис. 4. Ассоциация уровней метилирования исследованных генов миРНК с показателями прогрессии рака яичников. *a* – с более распространенными III-IV клиническими стадиями; *b* – со снижением степени дифференцировки (G3-G4) опухоли.

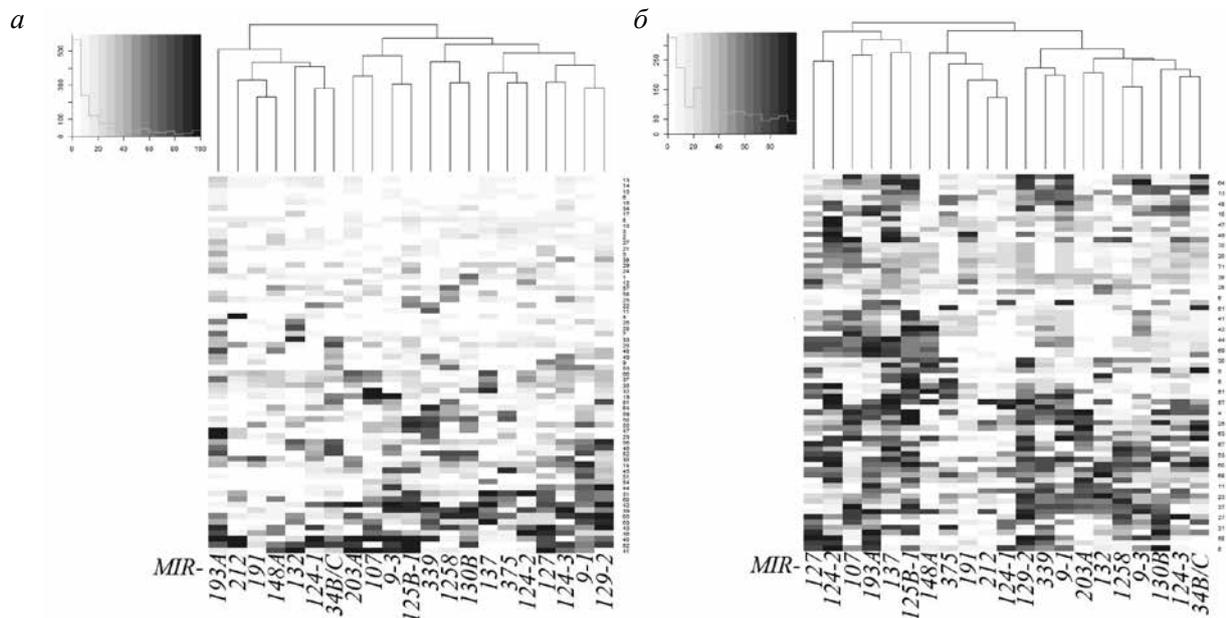


Рис. 5. Сравнение уровней метилирования 21 гена миРНК в первичных опухолях больных раком яичников. *а* – без метастазов; *б* – с метастазами.

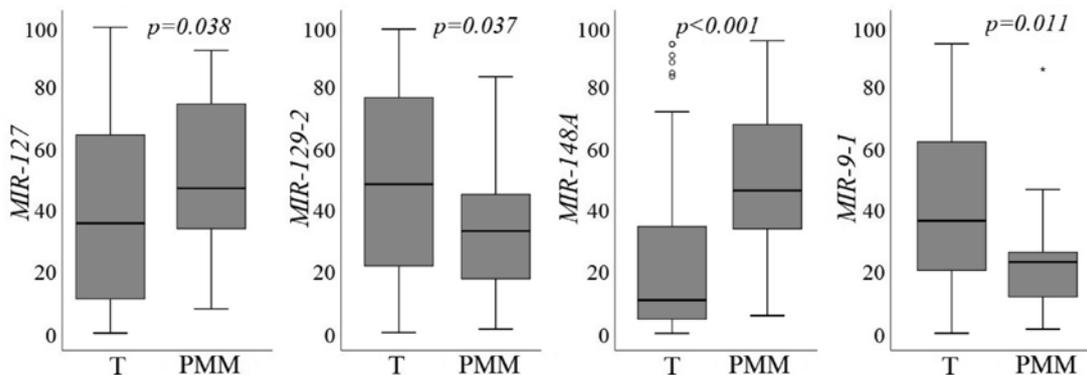


Рис. 6. Сравнение уровней метилирования генов миРНК в 30 образцах перитонеальных макроскопических метастазах (PMM) и в 72 образцах первичных опухолей (Т) больных раком яичников с метастазами.

Интересно, что метилирование *MIR-148A* не было выявлено в первичных опухолях от больных ни с метастазами, ни без метастазов. Таким образом, значительное увеличение уровня метилирования гена *MIR-148A* в образцах перитонеальных макроскопических метастазах указывает на возможную роль этой миРНК в формировании метастазов у больных РЯ и может служить специфичным фактором этого процесса.

Ранее клиническая значимость метилирования генов миРНК для больных РЯ была определена для некоторых генов миРНК в образцах опухолей 26 пациенток [6]. В данной работе нами на представительной выборке 138 образцов РЯ установлена высоко значимая ($p < 0,001$, $FDR = 0,01$) связь метилирования 17 генов миРНК (*MIR-107*, *MIR-124-1/-2/-3*, *MIR-125-B1*, *MIR-1258*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-130B*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-191*, *MIR-193A*, *MIR-339*, *MIR-34B/C*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*) с патогенезом данного вида рака. Эти 17 aberrантно метилиро-

ванных генов миРНК представляют группу потенциальных маркеров для диагностики РЯ.

Далее нами показано высоко значимое ($p < 0,001$, $FDR = 0,01$) снижение экспрессии 10 миРНК (*miR-125b-5p*, *miR-127-5p*, *miR-129-5p*, *miR-132-3p*, *miR-137-3p*, *miR-148a-3p*, *miR-193a-5p*, *miR-212-3p*, *miR-219a-5p* и *miR-339-3p*), среди которых для 7 миРНК (*miR-125b-5p*, *miR-127-5p*, *miR-129-5p*, *miR-132-3p*, *miR-137-3p*, *miR-193a-5p*, *miR-339-3p*) выявлено также гиперметилирование генов, кодирующих эти миРНК. На примере ряда миРНК показана статистически значимая ($p < 0,001$, $FDR = 0,01$; $p < 0,05$, $FDR = 0,05$) связь между изменениями уровня метилирования и экспрессии. Все эти данные подтверждают функциональную роль метилирования генов миРНК в подавлении их экспрессии в опухолях яичников. Сниженная экспрессия 10 миРНК имеет потенциал диагностических маркеров РЯ.

Снижение экспрессии 6 миРНК (miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-137-3p, miR-193a-5p), связанное с метилированием кодирующих их генов, указывает на супрессорные функции этих миРНК. Этот результат согласуется с результатами других исследований для этих миРНК [9-12].

Следует отметить, что сниженная экспрессия miR-339-3p и гиперметилирование гена *MIR-339*, позволяющие предполагать супрессорные свойства miR-339-3p, обнаружены нами впервые.

Две миРНК miR-203a-3p и miR-375-3p с обнаруженной нами высоко значимой ($p < 0,001$, FDR=0,01) повышенной экспрессией, по данным литературы, показывают неоднозначные свойства и онкогенов, и супрессоров [13-15].

Ассоциация повышенного уровня метилирования генов миРНК (*MIR-124*, *MIR-125B*, *MIR-130B*, *MIR-137*) в первичных опухолях больных с метастазами согласуется с описанной ранее антиметастатической функцией кодируемых ими миРНК: miR-124, miR-125b, miR-130b и miR-137 (см. например, [16-18]). Данные о роли миРНК miR-107, miR-127, miR-129 в метастазировании РЯ в работах других авторов не обнаружены (PubMed, 2022.11.04) и они представляют интерес как новые потенциальные маркеры для выявления метастазирования в первичных опухолях больных РЯ.

В макростазисах в брюшной полости относительно первичных опухолей от пациентов с метастазами нами обнаружено высоко значимое ($p < 0,001$, FDR=0,01) повышение уровня метилирования гена *MIR-148A*, менее значимое ($p < 0,05$) повышение метилирования гена *MIR-127* и снижение уровней метилирования *MIR-129-2* и *MIR-9-1*. Из результатов зарубежных исследований следует, что сниженная экспрессия miR-148a ассоциирована с метастазированием РЯ в лимфатические узлы, а введение miR-148a может подавлять миграцию и инвазию клеток [19, 20]. Однако, данных о роли miR-148a в перитонеальном метастазировании, которое наиболее характерно для РЯ, и тем более, при анализе самих макроскопических метастазов в брюшной полости, не выявлено (PubMed, 2022.11.04). Таким образом, наш результат о роли гиперметилирования miR-148a в формировании перитонеальных метастазов при РЯ является приоритетным и даёт возможность предполагать, что aberrantное метилирование гена *MIR-148A* может являться специфическим фактором развития такого вида метастазирования.

Интерес представляет и наш результат о снижении уровней метилирования *MIR-129-2* и *MIR-9-1* при сравнении макроскопических метастазов в брюшине с первичными опухолями больных, поражённых метастазированием. Одной из критических стадий метастазирования является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который инициируется на разных этапах метастатического процесса, что провоцирует миграцию и инвазию опухолевых клеток и запускает метастазирование [21]. Ранее было обнаружено, что при метастазировании РЯ в брюшину происходит неполный обратный процесс от ЭМП к ме-

зэнхимально-эпителиальному переходу (МЭП) [22, 23]. Снижение уровней метилирования *MIR-129-2* и *MIR-9-1* в макроскопических метастазах в брюшине может указывать на деметилирование генов *MIR-129-2* и *MIR-9-1*, что является одним из видимых изменений при перепрограммировании клеток в процессе ЭМП-МЭП при образовании метастазов. Следует подчеркнуть, что в нашем приоритетном исследовании метилирования генов длинных некодирующих РНК при анализе перитонеальных метастазов РЯ, мы также выявили аналогичный эффект при ЭМП-МЭП переходе [24].

Обнаруженные нами закономерности углубляют понимание механизма развития и прогрессирования РЯ, включая формирование макроскопических метастазов в брюшной полости. Идентифицированные нами 17 потенциальных диагностических маркеров злокачественных опухолей яичников, из которых 8 ассоциированы с развитием метастатического РЯ, а также маркер *MIR-148A*, специфичный для развития перитонеальных макроскопических метастазов, могут иметь клиническую значимость.

ЛИТЕРАТУРА (пп 1–5, 7–24 см. REFERENCES)

6. Кушлинский Н.Е., Уткин Д.О., Логинов В.И., Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Кушлинский Д.Н. и др. Клиническая значимость метилирования группы генов микроРНК у больных раком яичников. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(5):321–7.

REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 2019; 69(1):7–34.
2. Tan D.S., Agarwal R., Kaye S.B. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7(11):925–34.
3. Cohen M., Petignat P. The bright side of ascites in ovarian cancer. *Cell Cycle.* 2014; 13(15):2319.
4. van Baal J., van Noorden C.J.F., Nieuwland R., Van de Vijver K.K., Sturk A., van Driel W.J., Kenter G.G., Lok C.A.R. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. *J. Histochem. Cytochem.* 2018; 66(2):67–83.
5. Piletic K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch. Toxicol.* 2016; 90(10):2405–19.
6. Kushlinskii N.E., Utkin D.O., Loginov V.I., Filippova E.A., Burdenny A.M., Kushlinsky D.N. et al. Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in patients with ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(5):321–7. (in Russian)
7. TNM Classification of Malignant Tumours. J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind, eds. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2017.
8. Loginov V.I., Burdenny A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Lukina S.S., Kazubskaya T.P. et al. Aberrant Methylation of 21 MicroRNA Genes in Breast Cancer: Sets of Genes Associated with Progression and a System of Markers for Predicting Metastasis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021; 172(1):67–71.
9. Chen P., Sun L.S., Shen H.M., Qu B. LncRNA KCNQ1OT1 accelerates ovarian cancer progression via miR-125b-5p/CD147 axis. *Pathol. Res. Pract.* 2022; 239:154135.
10. Liu X., Meng Z., Xing Y., Zhong Q., Zhang X., Qu J. MiR-127 inhibits ovarian cancer migration and invasion by up-regulating ITGA6. *Minerva Med.* 2021; 112(2):309–10.
11. Jiang H., Dai M., Wu Y., Dong Y., Qi L., Xi Q., Liang G. iroRNA-132 inhibits the proliferation, migration, and invasion of ovarian cancer cells by regulating CT10 oncogenic gene homo-

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- log II-related signaling pathways. *Transl. Cancer Res.* 2020; 9(7):4433–43.
12. Zhang S., Liu J., He J., Yi N. MicroRNA-193a-5p exerts a tumor suppressive role in epithelial ovarian cancer by modulating RBBP6. *Mol. Med. Rep.* 2021; 24(2):582.
 13. An N., Zheng B. MiR-203a-3p Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation, EMT, and Apoptosis by Regulating SLUG. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2020; 19:1533033819898729.
 14. Tang W., Li G.S., Li J.D., Pan W.Y., Shi Q., Xiong D.D., Mo C.H., Zeng J.J., Chen G., Feng Z.B., Huang S.N., Rong M.H. The role of upregulated miR-375 expression in breast cancer: An in vitro and in silico study. *Pathol. Res. Pract.* 2020; 216(1):152754.
 15. Yang S., Yang R., Lin R., Si L. MicroRNA-375 inhibits the growth, drug sensitivity and metastasis of human ovarian cancer cells by targeting PAX2. *J. BUON.* 2019; 24(6):2341–6.
 16. Yang X., Wang J., Li H., Sun Y., Tong X. Downregulation of hsa_circ_0026123 suppresses ovarian cancer cell metastasis and proliferation through the miR-124-3p/EZH2 signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2021; 47(2):668–76.
 17. Bi Y.N., Guan J.P., Wang L., Li P., Yang F.X. Clinical significance of microRNA-125b and its contribution to ovarian carcinogenesis. *Bioengineered.* 2020; 11(1):939–48.
 18. Dong P., Xiong Y., Watari H., Hanley S.J., Konno Y., Ihira K., Yamada T., Kudo M., Yue J., Sakuragi N. MiR-137 and miR-34a directly target Snail and inhibit EMT, invasion and sphere-forming ability of ovarian cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016; 35(1):132.
 19. Gong L., Wang C., Gao Y., Wang J. Decreased expression of microRNA-148a predicts poor prognosis in ovarian cancer and associates with tumor growth and metastasis. *Biomed. Pharmacother.* 2016; 83:58–63.
 20. Yang Q., Dong Y.J. LncRNA SNHG20 promotes migration and invasion of ovarian cancer via modulating the microRNA-148a/ROCK1 axis. *J. Ovarian Res.* 2021; 14(1):168.
 21. Dongre A., Weinberg R.A., New insights into the mechanisms of epithelial – mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(2):69–84.
 22. Davidson B., Trope C.G., Reich R. Epithelial – mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Front. Oncol.* 2012; 2:33.
 23. Loret N., Denys H., Tummers P., Berx G. The Role of Epithelial - to - Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers.* 2019; 11(6):838.
 24. Burdenny A.M., Filippova E.A., Ivanova N.A., Lukina S.S., Pronina I.V., Loginov V.I. et al. Hypermethylation of Genes in New Long Noncoding RNA in Ovarian Tumors and Metastases: A Dual Effect. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021; 171(3):370–4.