

На правах рукописи

ГУБЕНКО МАРИНА СЕРГЕЕВНА

**РОЛЬ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ГРУППЫ
ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Логинов Виталий Игоревич**

Официальные оппоненты:

Тоневицкий Александр Григорьевич – член-корреспондент Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор, декан факультета биологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»

Пикин Олег Валентинович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением торакальной хирургии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена» – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «07» декабря 2023 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.180.01 при ФГБНУ «НИИОПП» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте: <http://www.niioopp.ru/>

Автореферат разослан «03» ноября 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В последние годы количество онкологических заболеваний неуклонно растёт. В структуре онкологических заболеваний рак лёгкого занимает первые позиции по заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей, как в мире, так и в России (Sung H. *et al.*, 2021). В России от рака легкого умирают около 40 тыс. человек в год, причем в ряде регионов смертность у мужчин выше, чем в большинстве стран мира, достигая более 60 случаев на 100 тыс. человек. На немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) приходится 80-90% всех мировых случаев выявления злокачественных опухолей легкого. Причём этот вид рака легкого отличается частым метастазированием, а именно в 40% случаев на момент постановки диагноза.

Аномальное функционирование и измененный профиль экспрессии генов системы контроля клеточного цикла, программируемой клеточной гибели и внутреннего гомеостаза клетки являются ключевым свойством злокачественного процесса, в том числе, и НМРЛ (Hanahan D. *et al.*, 2022). Исследования последних лет показывают, что эпигенетические нарушения (не затрагивающие структуру ДНК), в совокупности с генетическими изменениями, составляют комплекс механизмов, ответственных за формирование фенотипа опухолевой клетки (Irfan J. *et al.*, 2022; Campbell K.A. *et al.*, 2020).

Эпигенетические механизмы, в том числе метилирование ДНК и изменение экспрессии микроРНК (миРНК), необходимы для тонкой, динамичной и специфичной по времени и локализации регуляции экспрессии генов. Изменение уровня метилирования ДНК наблюдается при онкологических заболеваниях, при которых происходит массивное деметилирование генома клетки и избирательное гиперметилирование промоторных CpG-островков генов, обладающих опухоль-супрессорными свойствами (Mehta A. *et al.*, 2015). В зарубежной и отечественной литературе показана важная роль изменчивой экспрессии генов миРНК в процессах злокачественной трансформации (Логинов В.И. и др., 2015; Hanahan D. *et al.*, 2022).

Правильная оценка потенциала молекулярных изменений при онкологических заболеваниях, с учетом клинико-патофизиологических

особенностей клеток опухоли, может значительно повысить эффективность диагностики и прогноза злокачественных новообразований, а также позволит более точно определить ход заболевания, что будет влиять на выбор тактики лечения и объем хирургического вмешательства. Методы ранней диагностики многих онкологических заболеваний остаются низкоэффективными, что представляет проблему для клиницистов при выявлении опухолей различной локализации. Более того, независимо от времени обнаружения злокачественного новообразования, требуется уточнить многие детали выявленной опухоли, её патоморфологические особенности. Поэтому так важен поиск новых маркеров, которые могут быть использованы для ранней диагностики, более точного прогнозирования течения и исхода заболевания.

На основании всего вышеизложенного нами были сформулированы следующие цель и задачи исследования.

Цели и задачи исследования

Целью работы являлось определение роли аномальной экспрессии миРНК и аномального метилирования ДНК в регуляции экспрессии опухоль-ассоциированных генов, связанных с процессами программируемой клеточной гибели, в патогенезе НМРЛ. Для достижения поставленной цели сформулированы следующие *задачи*:

1. На выборке парных (опухолевая / нормальная ткань) образцов от пациентов с НМРЛ провести анализ уровня метилирования группы белоккодирующих генов (*DAPK1, APAF1, VIM, BAX, BCL2*) и генов миРНК (*MIR124-1/2/3, 125B-1, 127, 129-2, 137, 375, 339, 1258*) и определить aberrантно метилированные гены, вовлеченные в патогенетические механизмы развития НМРЛ.

2. Оценить изменение уровня метилирования двух групп генов с учетом прогрессии опухоли: увеличения размера опухоли, снижения степени дифференцировки опухолевых клеток, лимфогенного метастазирования.

3. Выявить особенности экспрессии белоккодирующих генов и генов миРНК на клинических образцах НМРЛ. Оценить влияние метилирования

собственных CpG-островков белоккодирующих генов и генов миРНК на их экспрессию.

4. Оценить возможность существования новых взаимодействующих пар миРНК – мРНК ген-мишень, принимающих участие в развитии НМРЛ, на основе анализа уровней аномальной экспрессии белоккодирующих генов и генов миРНК.

5. Оценить возможность использования значений уровня метилирования исследованных генов как потенциальных маркеров для диагностики и/или прогноза НМРЛ.

Научная новизна работы

На выборке из 70 парных образцов НМРЛ впервые показан аномально высокий уровень метилирования генов MIR124-1/2/3, MIR125B-1, MIR129-2, MIR137, MIR1258 и MIR339, а также генов BIM и BAX в опухолевой ткани, по сравнению с прилежащей гистологически нормальной тканью легкого.

Впервые показано, что уровень метилирования промоторных районов генов BIM, BAX и генов миРНК MIR125B-1, MIR127, MIR137, MIR1258, MIR339 значительно повышался при переходе от ранних стадий к более поздним тяжелым стадиям развития опухоли.

Впервые в опухолях больных НМРЛ показано статистически значимое изменение уровня экспрессии мРНК белоккодирующего гена BAX в связи с изменением статуса метилирования его промотора, что указывает на функциональную роль метилирования в нарушении регуляции данного гена.

Впервые у пациентов с НМРЛ установлена статистически значимая обратная зависимость между уровнями экспрессии мРНК белоккодирующих генов и миРНК, участвующих в программируемой клеточной гибели: miR-125b-5p – BCL2/DAPK1; miR-127-5p – BCL2; miR-375 – BCL2/BIM/DAPK1; miR-339-3p – DAPK1.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявление аномальной экспрессии и/или метилирования в генах *DAPK1*, *APAF1*, *VIM*, *BAX*, *BCL2* и регуляторных миРНК делает их перспективными в изучении механизмов канцерогенеза НМРЛ и его гистологических подтипов – аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого.

Полученные результаты открывают перспективы для разработки более эффективных методов диагностики и лечения НМРЛ. Так, на основе данных по aberrантному метилированию промоторных районов генов миРНК построены новые системы маркеров с высоким диагностическим потенциалом.

Материалы диссертации могут быть включены в курс лекций биологических факультетов университетов, медицинских ВУЗов, на курсах повышения квалификации медицинских работников.

Положения, выносимые на защиту

1. Высокий уровень метилирования в промоторных районах белоккодирующих генов и генов миРНК в опухолевой ткани у пациентов с НМРЛ приводит к инактивации экспрессии этих генов, что влечет за собой снижение уровня дифференцировки клеток, увеличение размера опухоли, формирование метастазов в лимфатических узлах.

2. Аномальная экспрессия миРНК miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-339-3p, miR-375 в опухолевой ткани НМРЛ приводит к инактивации и/или активации экспрессии мРНК генов *BCL2*, *VIM*, *DAPK1*.

3. Метилирование промоторных районов генов миРНК может стать новым диагностическим маркером возникновения НМРЛ.

Личный вклад автора

Диссертационная работа основана на собственных данных, полученных автором в период с 2020-2023 гг. Автором, совместно с научным руководителем, разработана концепция исследования, самостоятельно проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, сформулированы цель и задачи исследования, определены методы, необходимые для выполнения исследования. Автором самостоятельно выполнены статистический анализ полученных данных и интерпретация результатов. Автор

лично участвовал в подготовке научных статей по теме диссертации. Результаты работы представлены автором в докладах на российских конференциях.

Степень достоверности результатов проведённых исследований

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов исследования и статистического анализа. Исследование выполнено с одобрения и под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП». Выводы полностью отражают полученные результаты.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, из которых 4 статьи в российских рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для защиты диссертаций.

Структура и объём диссертации

Работа изложена на 122 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, главы результатов исследований и их обсуждений, выводов и перечня цитируемой литературы, состоящего из 213 источников (38 отечественных и 175 зарубежных). Рукопись содержит 13 таблиц и 23 рисунка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая работа основана на анализе биологического материала, взятого у больных с НМРЛ и полученного в отделе патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288) и с разрешения локального этического комитета института по согласованию с этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Сбор и клинико-морфологические характеристики парных (опухоль/норма) образцов больных НМРЛ

Для выполнения исследования были взяты парные образцы опухолевой и здоровой ткани операционного материала опухолей НМРЛ от 70 пациентов с соответствующим диагнозом, среди которых 39 случаев с плоскоклеточным раком и 31 с аденокарциномой легкого. Возраст пациентов находился в диапазоне от 34 до 80 лет, из которых 53 (75,71%) – мужчины и 17 (24,29%) – женщины, проходивших лечение в период с 1995 по 2013 год. Диагноз выставлен на основании гистологического заключения. В качестве контроля взяты образцы гистологически здоровой ткани пациентов. Все пациенты находились на лечении в ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Для выполнения экспериментального исследования из парных образцов ткани НМРЛ проводили выделение высокомолекулярной ДНК и РНК.

1. Выделение ДНК из замороженных образцов операционного биоматериала проводили стандартным фенол-хлороформным методом.
2. Суммарную РНК выделяли из ткани опухоли и парной гистологически нормальной ткани с помощью модифицированного метода гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции.

Оценка экспрессии белок-кодирующих генов методом SYBR Green ПЦР в реальном времени

Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Определение уровня экспрессии мРНК генов *APAF1*, *BCL2*, *DAPK1*, *VIM/BCL2L11*, *BAX/BCL2L4* проводили ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) по технологии SYBR Green с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (5x) в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSystem (Bio-Rad, США).

Оценка экспрессии генов микроРНК методом TaqMan ПЦР в реальном времени

Синтезированную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки количественной ПЦР-РВ, применяя комплекты реагентов,

содержащих зонды и специфичные праймеры к миРНК по протоколам коммерческого набора TaqMan®MicroRNA Assays Kit (Thermo Fisher Scientific, США) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSystem (Bio-Rad, США).

Оценка уровня метилирования белок-кодирующих генов и генов миРНК

Для определения уровня метилирования промоторных CpG-островков белок-кодирующих генов (*APAF1*, *BCL2*, *DAPK1*, *VIM/BCL2L11*, *BAX/BCL2L4*) и генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *-1258*, *-125B-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-339*, *-375*) использовали бисульфитную модификацию с последующей ПЦР-РВ (МС-ПЦР-РВ) по технологии SYBR Green на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов

Расчеты проводили в программах Microsoft Excel 2019, IBM SPSS Statistics 22.0. В случае распределений, не соответствующих нормальному, использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни для несвязанных выборок. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера. Степень влияния метилирования и/или экспрессии миРНК на уровень экспрессии белок-кодирующих генов оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Различие групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Аберрантное метилирование белоккодирующих генов и генов миРНК при НМРЛ

Методом МС-ПЦР-РВ исследованы уровни метилирования промоторных CpG-островков генов *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM* и *DAPK1*. Исследование выполнено на выборке из 35 парных образцов ДНК НМРЛ. Используя критерий Манна-Уитни для независимых выборок, было показано статистически значимое увеличение уровней метилирования генов *APAF1* ($p < 0,01$), *BAX* ($p < 0,01$), *VIM* ($p < 0,05$) и *DAPK1* ($p < 0,01$) в опухолевой ткани НМРЛ (Рис 1А). Напротив, статистически значимое деметилирование отмечено у анти-апоптозного гена

BCL2 ($p < 0,05$) (Рис 1А). Полученные данные позволяют предполагать вовлеченность этих генов в патогенез НМРЛ.

Проведен анализ статуса метилирования 10-ти генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *-125B-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-375*, *-1258*, *-339*) на выборке из 70 парных (опухоль / парная гистологически неизменная прилежащая к опухоли ткань) образцов НМРЛ, включая 39 случаев с плоскоклеточным раком (ПРЛ) и 31 с аденокарциномой (АД) легкого, методом МС-ПЦР-РВ. Уровень метилирования был статистически значимо выше в образцах опухоли, чем в гистологически неизменной ткани НМРЛ у 8-и генов миРНК: *MIR124-1/2/3*, *-125B-1*, *-129-2*, *-137*, *-1258*, *-339* ($p < 0,01$) (Рис 1Б). Высокий уровень метилирования гена миРНК *MIR339* в опухолевых образцах НМРЛ показан впервые.

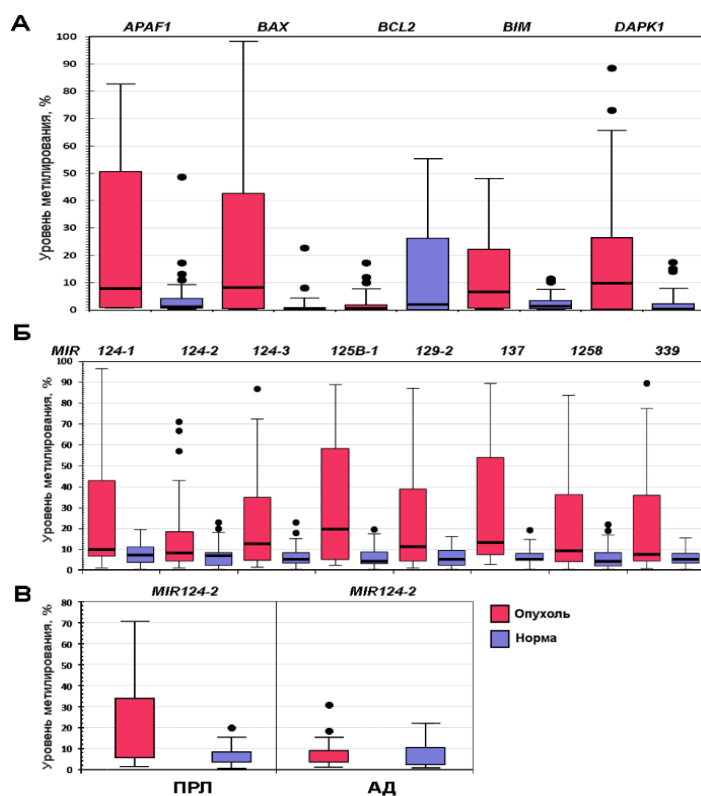


Рисунок 1. Сравнение уровня метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM* и *DAPK1* (А) и 8 генов миРНК (Б) в образцах опухоли и гистологической ткани от пациентов с НМРЛ; гена *MIR124-2* – у пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПРЛ) и аденокарциномой (АД) легкого (В).

При сопоставлении результатов анализа изменения уровней метилирования генов миРНК при разных гистологических подтипах НМРЛ показано, что

уровень метилирования 7 генов миРНК *MIR124-1/3*, *125B-1*, *129-2*, *137*, *1258* и *339* был статистически значимо высоким как в образцах ПРЛ, так и АД по сравнению с условной нормой ($p < 0.05$). В то же время, для ПРЛ показано увеличение уровня метилирования в опухолевой ткани по сравнению с нормальной для гена *MIR124-2* ($p < 0.01$) (Рис. 1В). Эти результаты позволяют предположить связь метилирования данных 8 генов с патогенезом НМРЛ.

2. Связь уровня метилирования белоккодирующих генов и генов миРНК с патофизиологическими параметрами прогрессии НМРЛ

Используя критерий Манна-Уитни для независимых выборок, был проведен анализ изменения уровня метилирования исследованных генов в зависимости от клинико-морфологических параметров опухолей легкого (клинической стадии, степени дифференцировки, размера опухоли, наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования, статуса курильщика).

Было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *APAF1*, *VAX*, *VIM* и *DAPK1*, на более тяжелых III-IV стадиях НМРЛ по сравнению с более ранними стадиями (I-II) (Рис. 2А). Также статистически значимо высокий уровень метилирования генов *APAF1*, *VIM*, *DAPK1* был связан с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4) (Рис. 2Б), а для генов *APAF1*, *VAX*, *DAPK1* – с наличием лимфогенного метастазирования (N0 против N1) (Рис. 3В). Для гена *VAX* было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования в низкодифференцированных (G3) образцах опухоли НМРЛ по сравнению с высоко- и среднедифференцированными образцами (G1/G2) (Рис. 3Г). Таким образом, полученные результаты указывают на вклад высокого уровня метилирования генов *DAPK1*, *VIM*, *VAX* и *APAF1* в прогрессию НМРЛ.

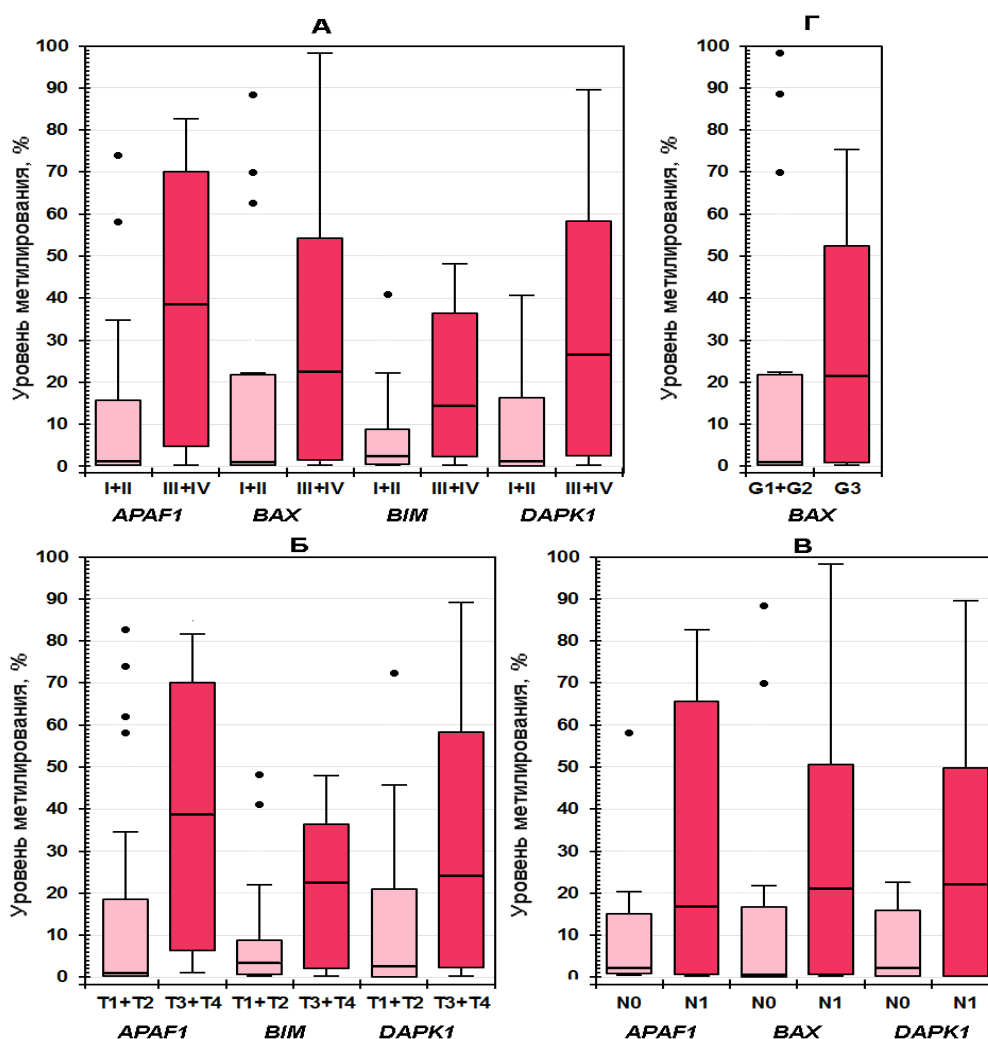


Рисунок 2. Связь уровня метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* и *DAPK1* с клинической стадией (А); размером опухоли (Б); лимфогенным метастазированием (В); степенью дифференцировки (Г) при НМРЛ.

Используя критерий Манна-Уитни для независимых выборок, был показан значимо высокий уровень метилирования трёх генов миРНК (*MIR124-1*, *-125B-1*, *-127*) в АД и ПРЛ на поздних (III, IV) стадиях онкологического процесса. Однако отмечен и специфичный профиль метилирования отдельных генов миРНК. Так, для генов *MIR124-2*, *-129-2* и *-339* выявлен значимо высокий уровень метилирования на поздних стадиях при ПРЛ, а для генов *MIR137* и *MIR1258* – на поздних стадиях при АД (Рис. 3А). При сравнении двух гистологических типов рака лёгкого на III и IV стадиях онкологического процесса наблюдался значимо более высокий уровень метилирования генов *MIR125B-1* и *MIR127* при ПРЛ, а *MIR124-1* при АД ($p < 0.01$) (Рис. 3А).

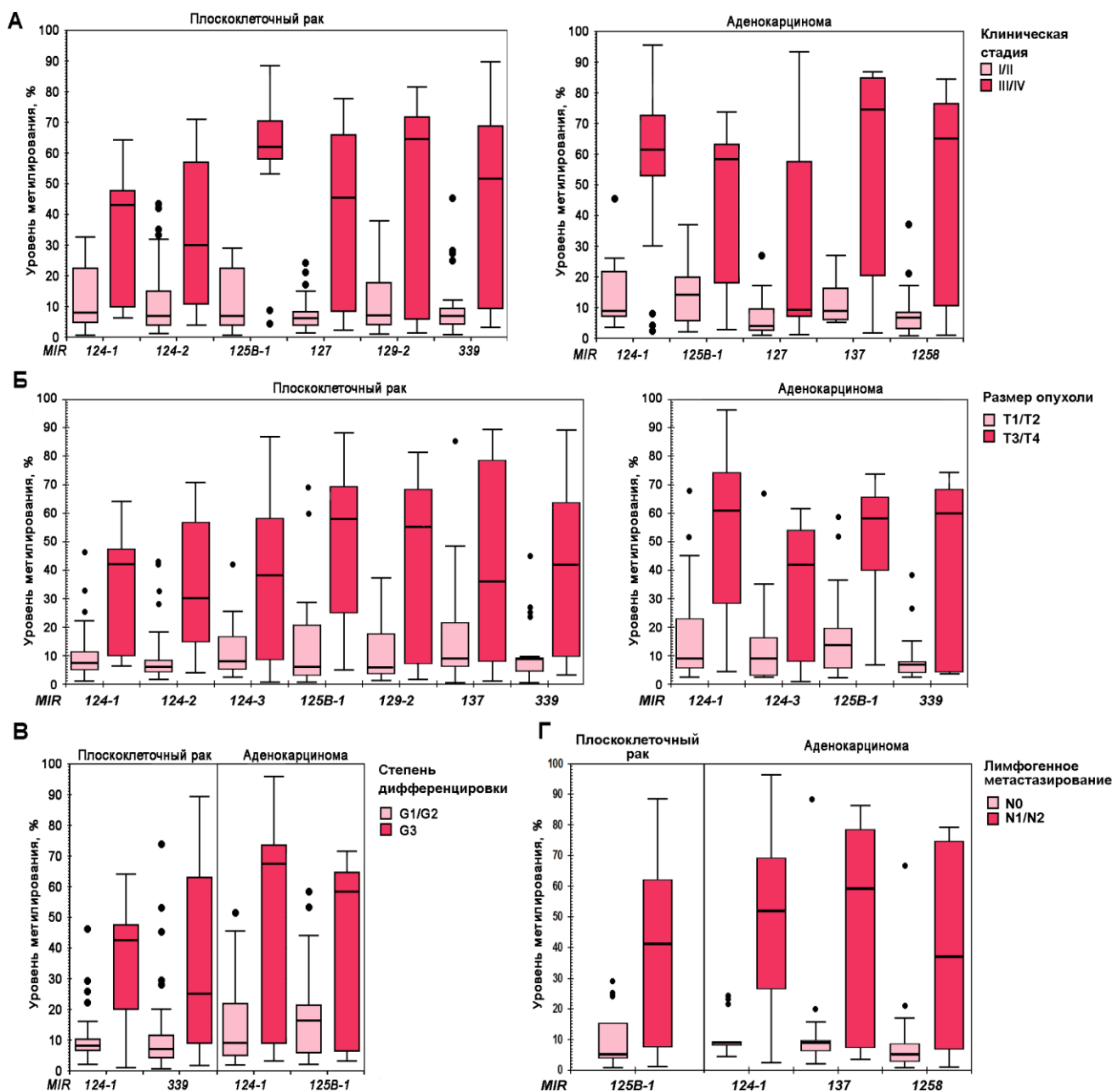


Рисунок 3. Связь уровня метилирования генов миРНК с клинической стадией (А); размером опухоли (Б); степенью дифференцировки (В); лимфогенным метастазированием (Г) при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого\

Установлено, что высокий уровень метилирования промоторных районов генов *MIR124-1/3*, *-125B-1* и *-339* ($p < 0,05$) связан с увеличением размера опухоли (T_3/T_4 (размер опухоли превышает 7 см)) при АД. В то же время, для ПРЛ выявлено увеличение уровня метилирования в опухолях большого размера для генов *MIR124-1/2/3*, *-129-2*, *-125B-1* и *-339* ($p < 0,01$) и *MIR137* ($p < 0,05$) (Рис. 3Б).

Показано значимое увеличение уровня метилирования генов *MIR124-1* и *MIR125B-1* в опухолях с низкой степенью дифференцировки клеток (G3) при АД и *MIR124-1* и *MIR339* при ПРЛ (Рис. 3В). При сравнении образцов АД и ПРЛ в группе больных с G3 стадией было показано значимое увеличение уровня метилирования гена *MIR124-2* при ПРЛ по сравнению с АД (18,75 (4,61; 57,00) против 6,23 (4,16; 7,76), $p < 0.01$).

Следует отметить, что высокий уровень метилирования в гене *MIR125B-1* был связан с лимфогенным метастазированием при ПРЛ, в то же время, лимфогенное метастазирование при АД связано с высоким уровнем метилирования генов *MIR124-1*, *MIR137* и *MIR1258* (Рис. 3Г).

Таким образом, полученные нами данные показывают роль метилирования 9 исследованных генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *-125B-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-1258*, *-339*) в патогенезе и прогрессии НМРЛ и его гистологических подтипов – ПРЛ и АД.

3. Аномальная экспрессия белок-кодирующих генов и генов миРНК при НМРЛ, связь с прогрессией

Методом количественной ПЦР в реальном времени был исследован профиль экспрессии 5-ти БКГ: *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* и 7 миРНК (*miR-124-3p*, *miR-125b-5p*, *miR-127-5p*, *miR-129-5p*, *miR-137*, *miR-339-3p*, *miR-375*), потенциально вовлеченных в программируемую клеточную гибель, на выборке из 35 парного (опухоль / гистологически нормальная прилежащая ткань легкого) образца НМРЛ. Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии про-апоптозного гена *BAX* и миРНК *miR-125b-5p*, *miR-375* (Рис. 4). В то же время, для гена *BCL2* и *miR-137* показано повышение уровня экспрессии в опухолевой ткани при НМРЛ (Рис. 4). Полученные результаты об изменении уровня экспрессии исследованных мРНК согласуются с процессами, протекающими в опухолевой клетке, а именно с подавлением одной из форм программируемой клеточной гибели – апоптоза.

Проведён анализ изменения уровня экспрессии белок-кодирующих генов и миРНК в зависимости от клинико-морфологических параметров НМРЛ

(клинической стадии, степени дифференцировки опухолевых клеток, размера опухоли, лимфогенного метастазирования).

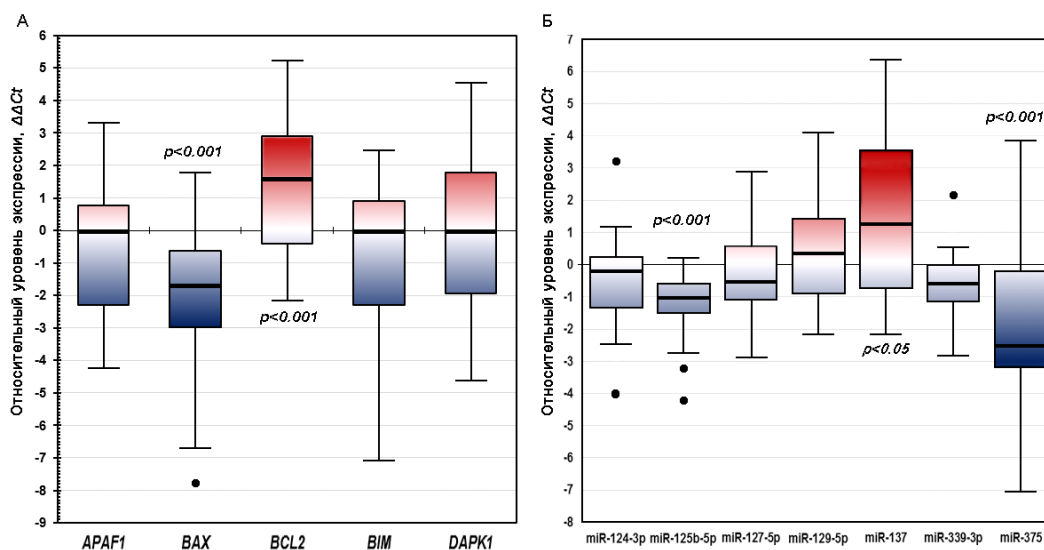


Рисунок 4. Диаграммы размахов значений уровня экспрессии 5-ти белоккодирующих генов (А) и 7 миРНК (Б), выраженных в значениях $-\Delta\Delta C_t$.

Выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии мРНК гена *BAX* в образцах с более тяжелой (III+IV) стадией онкологического процесса и лимфогенным метастазированием ($p < 0.05$). Показано, что в опухоли легкого большого размера (размер опухоли превышает 7 см) уровень экспрессии всех исследованных миРНК был значительно снижен, но только для miR-137 различие уровней экспрессии в образцах опухолей разного размера было статистически значимо ($p < 0.05$).

4. Связь метилирования белок-кодирующих генов с нарушением их экспрессии при НМРЛ

В результате изучения влияния аномального уровня метилирования на изменение уровня экспрессии 5-ти БКГ (*APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*) и 9-ти генов миРНК (*MIR124-1*/miR-124-3p, *MIR124-2*/miR-124-3p, *MIR124-3*/miR-124-3p, *MIR125B-1*/miR-125b-5p, *MIR127*/miR-127-5p, *MIR129-2*/miR-129-5p, *MIR137*/miR-137, *MIR375*/miR-375, *MIR339*/miR-339-3p) на общей выборке из 35

парных (опухоль / гистологически нормальная прилежащая ткань легкого) образцов, с использованием коэффициент корреляции Спирмена (R_s) были получены следующие данные.

Так, для гена *BCL2* было показано, что со снижением уровня метилирования в опухолевой ткани по сравнению с гистологически нормальной тканью легкого происходит статистически значимое ($R_s = -0,374$, $p < 0,05$) увеличение уровня экспрессии его мРНК. В то же время, для генов *APAF1*, *BAX*, *DAPK1* показано, что увеличение уровня метилирования в опухолевой ткани ведет к снижению уровня их экспрессии (Рис. 5) при НМРЛ.

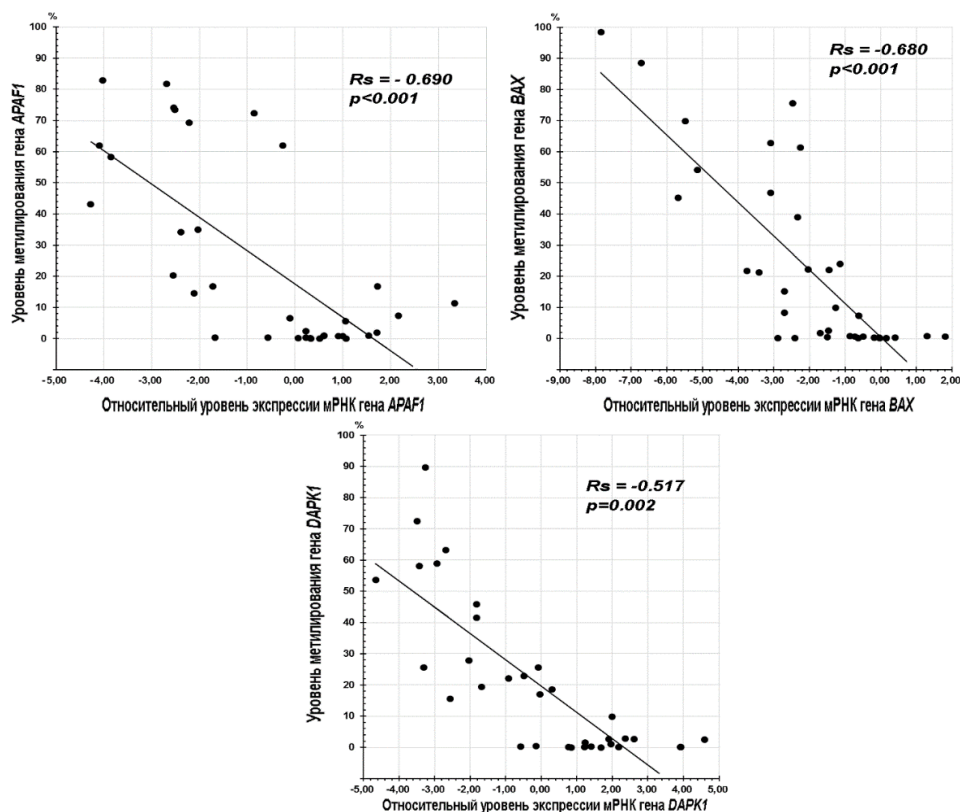


Рисунок 5. Связь между экспрессией мРНК и метилированием ДНК для генов *APAF1*, *BAX*, *DAPK1*.

Для генов миРНК и гена *VIM* статистически значимых корреляций между уровнем метилирования и уровнем их экспрессии, найдено не было. Только для гена *MIR375* отмечена тенденция снижения уровня экспрессии miR-375 при увеличении уровня метилирования гена.

Основываясь на полученных нами данных о сильной отрицательной корреляции метилирования с экспрессией, можно сказать, что полученные результаты свидетельствуют о том, что гиперметилование в опухоли является биологическим маркером изменения экспрессии генов мРНК.

5. Поиск взаимодействий миРНК – ген-мишень при НМРЛ

При НМРЛ проведено сопоставление данных по изменению экспрессии 7-ми миРНК (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-137, miR-339-3p, miR-375) и их потенциальных генов-мишеней (*APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*), предсказанных по данным miRWalk2.0, на выборке из 35 образцов. Конкордантность данных оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (R_s). По результатам анализа были установлены статистически значимые отрицательные корреляции для 7 пар (Рис. 6). Полученные результаты позволяют предполагать прямое или опосредованное взаимодействие между миРНК и мРНК в этих парах.

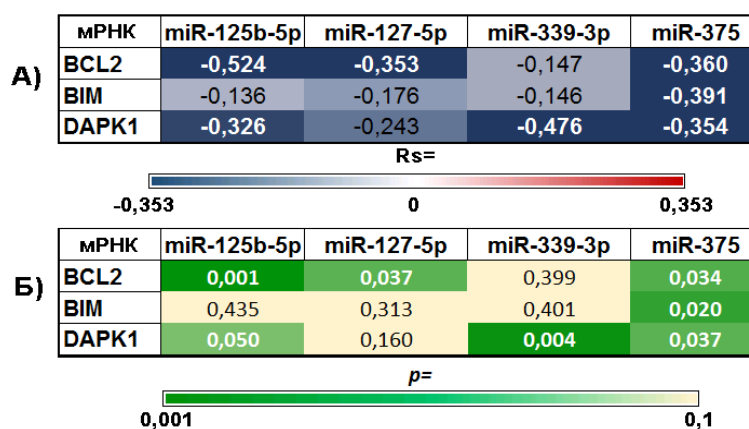


Рисунок 6. Потенциально-взаимодействующие пары миРНК – мРНК ген-мишень при НМРЛ; коэффициент корреляции Спирмена – R_s (А); статистическая значимость – $p =$ (Б).

6. Новые маркеры для диагностики и прогноза НМРЛ на основе метилирования генов миРНК

Использование миРНК в качестве диагностического инструмента обусловлено тем, что миРНК являются в основном тканеспецифичными, и соответственно связаны с типом опухоли, а также тем преимуществом, что они

могут стабильно обнаруживаться в разных биологических жидкостях организма. Присутствие миРНК в биожидкостях обусловлено пассивным высвобождением из опухолевых клеток в результате апоптоза и/или некроза тканей. Также предполагается, что миРНК активно секретируются опухолевыми клетками.

Для этого, полученные количественные значения уровня метилирования исследованных генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *-125B-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-375*, *-1258*, *-339*) дихотомизировали путем установки порогового значения уровня метилирования. Работа по определению пороговых значений была выполнена ранее в лаборатории патогеномики и транскриптомики «НИИОПП».

Полученные данные частоты встречаемости метилирования 10 генов миРНК, исследованных на выборке из 70 образцов от пациентов с НМРЛ, были использованы для оценки диагностических качеств панелей маркеров посредством ROC-анализа. В результате анализа полученных данных были отобраны гены, имеющие специфичность (Sp) при НМРЛ более 85%: *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR137*, *MIR1258* и *MIR339* (табл. 1).

На их основе были просчитаны комбинации диагностических панелей, состоящие из двух и более маркеров. По результатам анализа систем маркеров отобраны 2 панели, имеющие максимальную чувствительность и специфичность для выявления НМРЛ.

Таблица 1. Характеристики маркеров метилирования генов миРНК по диагностическому потенциалу при НМРЛ

Гены миРНК	AUC (95% CI)	Se (%) (95% CI)	Sp (%) (95% CI)	P
<i>MIR124-3</i>	0,698 (0,608-0,787)	50,0 (45,4-54,6)	85,7 (81,1-90,4)	0,0005
<i>MIR125B-1</i>	0,760 (0,678-0,842)	54,3 (50,1-58,5)	97,1 (92,9-100,0)	<10 ⁻⁴
<i>MIR137</i>	0,764 (0,682-0,846)	50,0 (45,8-54,2)	94,3 (90,1-98,7)	<10 ⁻⁴
<i>MIR1258</i>	0,711 (0,625-0,798)	48,6 (42,2-53,0)	95,7 (91,3-100,0)	<10 ⁻⁴
<i>MIR339</i>	0,640 (0,548-0,732)	37,1 (32,4-41,8)	90,0 (85,3-94,7)	0,004

Примечание: чувствительность (Se); специфичность (Sp); качество как диагностического маркера (AUC).

Первая диагностическая панель состоит из трех маркеров: *MIR125B-1*, *MIR1258* и *MIR339*. Она имеет высокие значения параметров чувствительности (92,7) и специфичности (85,8) и $AUC=0,967$ ($p<10^{-5}$), что характеризует ее как надежную и эффективную (Рис. 7А). Для второй диагностической панели были подобраны 4 маркера: *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR137*, и *MIR1258*, что позволило повысить чувствительность и специфичность выше 90% ($Se = 98,9$; $Sp = 94,5$; $AUC = 0,968$; $p=1 \times 10^{-6}$) (Рис. 7Б). Для достижения указанных параметров чувствительности, специфичности и величины $AUC \geq 0.96$ необходимо обнаружение метилирования двух из предложенных генов. Таким образом, предложенные нами системы маркеров могут быть потенциально применимы для диагностики НМРЛ.

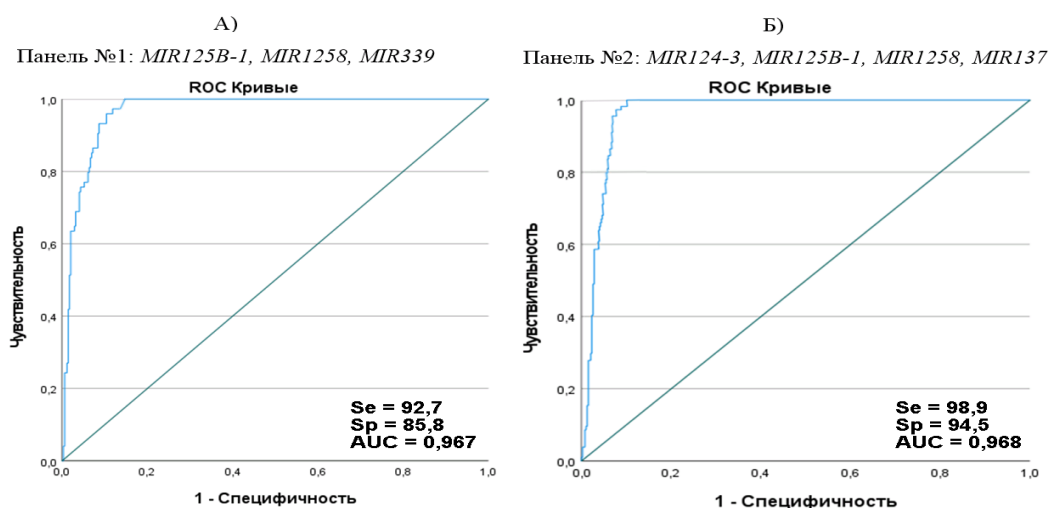


Рисунок 7. ROC-анализ систем маркеров для диагностики НМРЛ. А – панель из 3-х маркеров: *MIR125B-1*, *MIR1258* и *MIR339*; Б – панель из 4-х маркеров: *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR137*, и *MIR1258*.

ВЫВОДЫ

1. В опухолевой ткани у пациентов с НМРЛ установлено патологическое изменение уровня метилирования промоторных CpG-островков 5 белоккодирующих генов (DAPK1, BCL2, B1M, BAX, ARAF1) и 8 генов миРНК (MIR124-1/2/3, 125B-1, 129-2, 137, 1258, 339), что по-видимому является основой опухолевого роста рака легкого.
2. Определен специфичный профиль изменение уровня метилирования генов миРНК при аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого; выявлены как общие маркеры (например, при сопоставлении с условной нормой: MIR124-1/2, 125B-1, 129-2, 137, 1258), так и специфичные для каждого вида рака легкого (например, при сопоставлении с условной нормой, при ПРЛ - MIR124-2).
3. Определены белоккодирующие гены и гены миРНК, изменение уровня метилирования и экспрессии которых связано с прогрессированием НМРЛ (клинической стадией онкологического процесса, размером опухоли, лимфогенным метастазированием, степенью дифференцировки опухолевых клеток): DAPK1, B1M, BAX, ARAF1.
4. Показана статистически значимая корреляция между изменением уровня метилирования ДНК в промоторных районах генов DAPK1, BCL2, BAX, ARAF1 и изменением уровня экспрессии этих генов, что подтверждает участие метилирования в инактивации этих генов при НМРЛ.
5. Показана корреляция уровней экспрессии миРНК miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-339-3p, miR-375 в опухолевой ткани НМРЛ с патологическим изменением уровня экспрессии мРНК их генов-мишеней BCL2, B1M, DAPK1, что позволяет предполагать вовлеченность этих миРНК в общие патофизиологические процессы протекающие при прогрессировании НМРЛ.
6. Набор маркеров, включающий MIR125B-1, MIR1258, MIR137, MIR124-3, может быть использован как панель для диагностирования немелкоклеточного рака легкого с высоким потенциалом (Se = 98.9%, Sp = 94.5%, AUC=0.968).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в рецензируемых научных изданиях
по специальности 3.3.3. Патологическая физиология**

1. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хохлова С.В., Перцов С.С. Роль микроРНК в канцерогенезе немелкоклеточного рака легкого. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2022, Т. 30, № 1. С. 123–131.
2. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Казубская Т.П., Перцов С.С. Изменение уровня метилирования группы генов микроРНК как фактор развития и прогрессии немелкоклеточного рака лёгкого. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022, Т. 174, № 8. С. 222-227.
3. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хохлова С.В., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов апоптоза при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022, Т. 66, № 4. С. 5-12.
4. Пронина И.В., Губенко М.С., Бурдённый А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Механизмы регуляции уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ; связь с прогрессией. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023. Т. 67, № 3. С. 12-15

**Материалы в журналах и сборниках конференций,
не входящих в список ВАК**

5. Gubenko M.S., Burdenny A.M., Loginov V.I., Pronina I.V. Hypermethylated microRNA genes as potential markers of lung cancer. Virtual EMBL Conference: Cancer Genomics, 22-24 November 2021, Heidelberg, Germany. Abstract.
6. Губенко М.С., Бурденный А.М., Пронина И.В., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Гиперметилируемые гены микроРНК как потенциальные

- маркеры рака легкого. VI Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии с международным участием. 21-23 декабря 2021, Москва. *Успехи молекулярной онкологии*. Т. 8, № 4. С. 14
7. Губенко М.С., Бурдённый А.М., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И. Участие микроРНК при немелкоклеточном раке лёгкого. Конгресс с международным участием МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ-2022. 27–28 апреля 2022 г, Москва. Сборник материалов. С. 188.
 8. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Казубская Т.П. Метилирование опухоль ассоциированных генов микроРНК при аденокарциноме и плоскоклеточном раке легкого. VI междисциплинарная конференция с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» посвященная 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова. 6-8 июля 2022, Москва, Сборник тезисов. С. 166.
 9. Губенко М.С., Бурденный А.М., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И. Гены микроРНК, подверженные метилированию при немелкоклеточном раке легкого. VIII Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи - 2022», 27 июня-3 июля 2022г., Санкт-Петербург. Вопросы Онкологии, 2022, Том 68, №3, приложение 1. С. 108.
 10. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов *BCL2L11* и *BCL2L4* при немелкоклеточном раке легкого. «Вычислительная биология и искусственный интеллект для персонализированной медицины», 2–4 августа 2022 года, Москва. Сборник тезисов - С. 25-26.
 11. Губенко М.С., Пронина И.В., Бурдённый А.М., Логинов В.И. VIII Российский конгресс лабораторной медицины (РКЛМ 2022). 6-8 сентября 2022 г., Москва. Сборник тезисов. С. 9.
 12. Pronina, M. Gubenko, A. Burdennyu, V. Loginov. Hypermethylation of microRNA gene: potential in the diagnosis of lung cancer. "Molecular analysis

for precision oncology congress 2022" 14 - 16 Oct 2022, Amsterdam, Netherlands. *Annals of Oncology* (2022) 33 (suppl_8): S1383-S1430.

13. Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Брага Э.А., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов *BCL2L11* / *VIM* и *BAH* при немелкоклеточном раке легкого. VII Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии. 21-23 декабря 2022 г., Москва. *Успехи Молекулярной Онкологии*, 2022, 9 (4), Приложение. С. 64.