

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»**

На правах рукописи

Марина Сергеевна Губенко

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

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

к.б.н., ведущий научный сотрудник

Логинов В.И.

Москва – 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – аденокарцинома легкого

БКГ – белоккодирующий ген

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

миРНК – малая некодирующая РНК

мРНК – матричная РНК

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

НТО – нетранслируемая область

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

п.н. – пара нуклеотидов

ПГК – программируемая гибель клеток

ПРЛ – плоскоклеточный рак легкого

ПЦР – полимеразная цепная реакция (варианты: ПЦР-РВ - ПЦР в режиме реального времени, МС-ПЦР – метилспецифичная ПЦР, МС-ПЦР-РВ – количественная метил-специфичная ПЦР в режиме реального времени)

ПХТ – полихимиотерапии

РЛ – рак легкого

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТК – рак толстой кишки

РШМ – рак шейки матки

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

АРАФ1 – Apoptotic protease activating factor 1

AUC – Area Under Curve

BAH – BCL2 associated X protein

BCL2 – B-cell CLL/lymphoma 2, apoptosis regulator

BIM – Bcl-2 Interacting Mediator of cell death

DAPK1 – death associated protein kinase 1

MOPS (МОПС) – Морфолинпропансульфонової-3 кислоти натрієва сіль

RISC- RNA-induced silencing complex

ROC – receiver operating characteristic

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Канцерогенез. Основные понятия	11
1.2. Система эпигенетической регуляции	15
1.2.1. Метилирование ДНК.....	16
1.2.2. МикроРНК и рак.....	19
1.3. Опухоль-ассоциированные гены, участвующие в путях запрограммированной клеточной гибели	34
1.4. Рак лёгкого	42
1.5. Заключение.....	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Общая характеристика образцов НМРЛ	49
2.2. Выделение ДНК и РНК из биологического материала	50
2.2.1. Выделение геномной ДНК из ткани.....	50
2.2.2. Выделение суммарной (тотальной) РНК	51
2.3. Оценка экспрессии белок-кодирующих генов методом SYBR Green ПЦР в реальном времени.....	53
2.3.1. Реакция обратной транскрипции	53
2.3.2. SYBR Green ПЦР в реальном времени.....	53
2.4. Оценка экспрессии генов микроРНК методом TaqMan ПЦР-РВ.....	55
2.4.1. Реакция обратной транскрипции	55
2.4.2. ПЦР с детекцией в реальном времени.....	56
2.5. Бисульфитная конверсия ДНК.....	57
2.6. Метил-специфичная ПЦР-РВ (МС-ПЦР-РВ)	57
2.7. Программное обеспечение	59
2.8. Статистическая обработка результатов.....	59
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	61

3.1. Ассоциация aberrантного метилирования белоккодирующих генов и генов миРНК с развитием и прогрессией НМРЛ.....	62
3.2. Связь аномальной экспрессии белоккодирующих генов и миРНК с развитием НМРЛ и его гистологических подтипов.....	74
3.3. Роль aberrантного метилирования в нарушение экспрессии мРНК генов ARAF1, VAX, BCL2, VIM, DAPK1 и 9-ти генов миРНК при НМРЛ.....	77
3.4. Поиск взаимодействий миРНК – ген-мишень при НМРЛ.....	79
3.5. Метилирование генов миРНК – новый маркер для диагностики и прогноза НМРЛ.....	80
3.6. Влияние аномального метилирования и экспрессии генов DAPK1, ARAF1, VIM, VAX, BCL2 и миРНК на патогенез немелкоклеточного рака легкого	83
ВЫВОДЫ	92
ПРИЛОЖЕНИЕ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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. Причем этот вид рака легкого отличается частым метастазированием, а именно в 40% случаев на момент постановки диагноза. Пятилетняя выживаемость при диагностике на первой-второй стадии составляет 57-67%, на третьей – 5-25% и на четвертой – менее 1% (Каприна А.Д. и др., 2021). Поэтому, исследование процессов возникновения и прогрессии НМРЛ, а также выявление новых молекулярных маркеров являются важными направлениями современной молекулярной патологии и патофизиологии.

Ключевым свойством злокачественного процесса является аномальное функционирование и измененный профиль экспрессии генов системы контроля клеточного цикла, программируемой клеточной гибели и внутреннего гомеостаза (Hanahan D. et al., 2022). Исследования последних лет показывают, что эпигенетические нарушения (не затрагивающие структуру ДНК), в совокупности с генетическими изменениями (мутациями, делециями и амплификациями генов, хромосомными aberrациями), 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 и вовлечены у млекопитающих в процессы эмбрионального развития. Метилирование ДНК принимает участие в процессах развития и дифференцировки клеток, геномного импринтинга и др. (Monk D. et al., 2019). Изменение уровня метилирования ДНК наблюдается при различных патологиях, в том числе и 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).

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, BIM, 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 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

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

Выявление аномальной экспрессии и/или метилирования в генах *DAPK1*, *APAF1*, *BIM*, *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.

Методы и методология исследования

Настоящая работа основана на анализе биологического материала взятого у больных с немелкоклеточным раком легкого 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).

Работа выполнена на современном оборудовании с использованием современных методов молекулярной патофизиологии на базе лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии» (и.о. заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Брага Э.А.).

Для выполнения экспериментального исследования из парных образцов ткани НМРЛ проводили выделение высокомолекулярной ДНК и РНК. Оценка уровня метилирования CpG-районов промоторных областей исследованных белоккодирующих генов и генов миРНК проводилась с применением бисульфитной конверсии ДНК с последующей МС-ПЦР-РВ. Для определения уровня экспрессии миРНК проводили количественную ПЦР-РВ с использованием TaqMan зондов, а для оценки уровня экспрессии мРНК белоккодирующих генов – SYBR Green красителем. Для решения

поставленных задач использовались современные методы биоинформатического и статистического анализа.

Основные 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 райнов 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 проведенных исследований.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методов исследования и статистического анализа. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, выполнялось по международным правилам работы с биоматериалом людей, в соответствии с принципами Хельсинкской

декларации ВМА (2013). Выводы полностью отражают полученные результаты.

Публикации по теме диссертации

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

Апробация работы

Результаты работы были доложены автором и обсуждены на следующих конгрессах и конференциях: Virtual EMBL Conference: Cancer Genomics (22-24 ноября, 2021, Гельдейберг, Германия), VI Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии с международным участием (21-23 декабря, 2021 и 21-23 декабря, 2022, Москва), конгрессе «Molecular analysis for precision oncology congress 2022» (14 - 16 октября, 2022, Амстердам, Нидерланды), конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и безопасность-2022» (27–28 апреля 2022, Москва), VI междисциплинарной конференции с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» посвященной 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова (6-8 июля, 2022, Москва), VIII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи - 2022» (27.06. – 03.07., 2022, Санкт-Петербург), конференции «Информационные технологии для персонализированной медицины» (2–4 августа, 2022, Москва), VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022) (6-8 сентября, 2022, Москва).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Канцерогенез. Основные понятия

Канцерогенез – это многоуровневый процесс накопления изменений, как генетического (мутации, полиморфизмы, делеции и др.), так и эпигенетического (аномальная экспрессия некодирующих РНК, aberrантное метилирование и др.) профиля, характеризующийся в конечном итоге изменениями в регуляции клеточного цикла, дифференцировки и т.д. (Nistico P, Ciliberto G. 2020; Kanwal R., et al., 2015). Следует отметить, что до клинической манифестации чаще всего проходит много времени (латентный период). Этот период характеризуется накоплением множества событий (генетические и эпигенетические изменения) с образованием клона, способного к неконтролируемой пролиферации и устойчивого к клеточной гибели. В этот период клетка проходит 3 этапа от инициации до трансформации. На этапе инициации клетка приобретает стойкие изменения, важную роль при этом играет механизм aberrантного изменения в геноме и эпигеноме. В этом процессе изменяется баланс в работе онкогенов, генов-супрессоров опухолевого роста и генов-модификаторов. К онкогенам относят такие гены, которые подвергаются в опухоли гипометилированию и подвержены потере импринтинга, что приводит к их неконтролируемой экспрессии. Гены-супрессоры – это наиболее активно экспрессирующиеся гены различных систем, участвующие в репарации повреждений ДНК, ингибировании деления клеток, индукции апоптоза и подавлении метастазов. Эта группа генов чаще всего подвергается гиперметилированию в опухоли, что препятствует их экспрессии, не давая, таким образом, подавлять экспрессию онкогенов (Kanwal R., et al., 2015).

Таким образом, генетическая и эпигенетическая вариабельность приводит к накоплению критических изменений, приводящих к развитию злокачественной трансформации клетки. Были сформулированы важнейшие свойства злокачественной клетки (рис. 1):

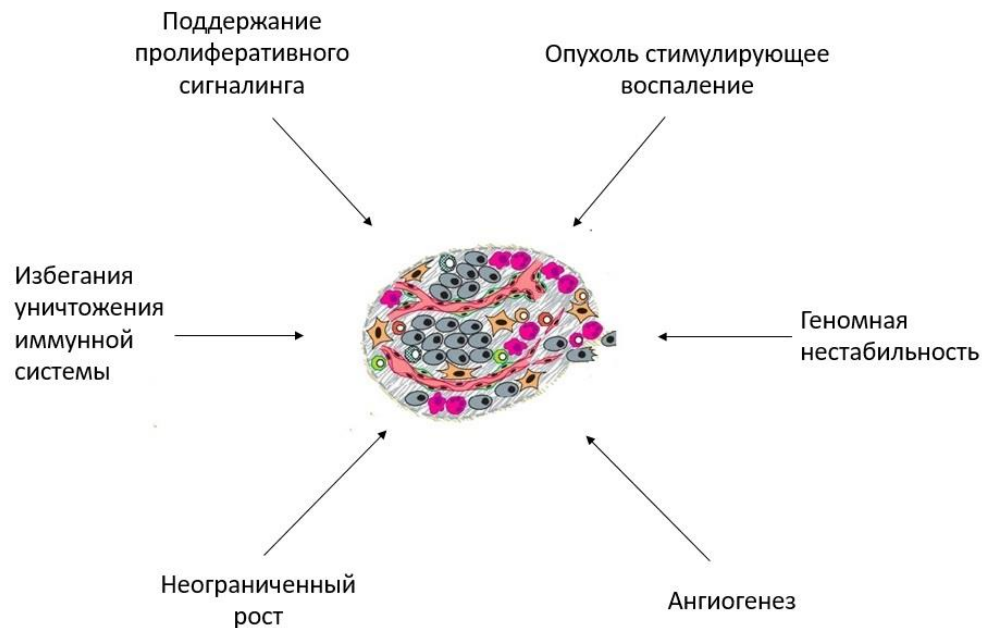


Рис. 1. Свойства злокачественной клетки

1) Это уменьшение необходимости во внешних сигналах для поддержания клеточной пролиферации (Zekri A. et al., 2013; Zacharia L.C. et al., 2017).

2) Пониженная чувствительность к антипролиферативным сигналам. Злокачественные клетки имеют сниженную чувствительность к факторам приобретенного и врожденного противоопухолевого иммунитета. Клетки пролиферируют при повреждении ДНК и иных стрессовых состояниях, например, гипоксии (Гудкова А.Я. и др., 2022; Cantelli G. et al., 2017).

3) Иммортализация (неограниченное деление клеток). Как правило в норме, в отличие от патологии, у человека происходит не более 50-70 делений клетки (Carels N. et al., 2016).

4) Устойчивость к программируемой клеточной гибели, соответственно, повышается жизнеспособность злокачественной клетки.

5) Неоангиогенез – это создание новой капиллярной сети. Если ангиогенеза не происходит, опухолевая клетка не получает необходимые вещества и умирает (Viallard C., Larrivee B. 2017).

б) Метастазирование. Первоначально, опухоль прорастает в ближайшую ткань и прилежащие лимфатические и кровеносные сосуды, после чего, с лимфо- и кровотоком распространяется по всему телу. Появляются микрометастазы, в результате которых появляются вторичные опухоли в жизненно важных органах (Hanahan D., 2014).

Стоит отметить, что большинство опухолей проходят так называемую стадию внутри опухолевой диверсификации, при которой возникают геномные изменения, не обнаруживающиеся в остальных популяциях клеток. Такая гетерогенность необходима опухоли для того, чтобы она смогла адаптироваться к меняющимся условиям микроокружения в организме (de Bruin E.C. et al., 2014). Наиболее важным свойством опухолевой клетки, как упоминалось выше, является процесс метастазирования. Данный процесс следует рассматривать в аспекте единого механизма с эпителиально-мезенхимальным переходом. За последние время был достигнут значительный прогресс в выяснении различных аспектов метастатической программы (Yan C. et al., 2021).

Процесс образования метастазов начинается с изменения микроокружения опухолевой клетки, затрагивая процессы инвазии, разрушения базальной мембраны клетками опухоли с последующим изменением адгезии клеток и клеточного матрикса (Perlikos F. et al., 2013). При этом, важной особенностью при разрастании опухолевой ткани является то, что данный процесс осуществляется в условиях гипоксии. В этих условиях при наличии некоторых хемоаттрактантов, в частности IL-6, VEGF-A и др., усиливается миграция мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к клеткам опухоли (Frisbie L. et al., 2022).

Важно отметить, что стромы играет важную роль в развитии и росте опухоли. В частности, при стрессовых условиях, таких как гипоксия, стромы опухоли может быть "активирована" с увеличением секреции сигнальных белков, таких как трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор некроза

опухоли- α (TNF- α), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF) (Sun Y., Ma L. 2015).

В ответ на эти сигналы часть популяции опухолевых клеток будет увеличивать свою подвижность и, в конечном итоге, метастазировать. До настоящего времени остается невыясненным важный аспект: связь между МСК и раковыми клетками происходит до или в результате активации стромы опухоли, или оба процесса активируются одновременно и независимо в результате гипоксии. Тем не менее, начальный этап метастазирования под влиянием этих соединений включает изменение эпителиального фенотипа раковых клеток на мезенхимальный. Данное событие носит название – эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) (Ishikawa, M. et al., 2014; Asif P.J. et al., 2021).

Далее развитие опухоли обусловлено каскадом различных процессов, приводящих как к молекулярным, так и физиологическим изменениям. Например, замечено влияние МСК на лизилоксидазу (LOX). Тканеспецифичность гена *LOX* обуславливает его двойственную функцию и при увеличении его экспрессии способствует развитию и прогрессии различных видов онкологии, в частности НМРЛ (Murdocca M. et al., 2021).

Важно отметить, что данный ген находится в тесном взаимодействии с каскадом CD44-TWIST. Этот каскад затрагивает многие гены и процессы, изменения в которых, в конечном итоге, приводят к дифференцировке клеток и усилению метастатического потенциала (Menju T., Date H. 2021). В результате клетки, подвергшиеся ЭМП, сначала теряют адгезию, а затем изменяют свой статус становясь циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК), приобретая свойства стволовых клеток опухоли (Menju T., Date H. 2021).

Последний завершающий этап метастатической активности связан с потерей мезенхимальных стволовых свойств и приобретением дифференцировки, характерной окружению (Mittal V., 2018). Этот процесс мало изучен и требует дальнейшего осмысления.

Все вышеперечисленное, подтверждает гипотезу, что появление злокачественных новообразований — это эволюционный процесс, нацеленный на сохранение приобретенных признаков опухолевых клонов (Hanahan D., 2022).

1.2. Система эпигенетической регуляции

В результате наблюдений за развитием заболевания у однояйцевых близнецов, имеющих одинаковый геномный набор, было выявлено различие в течении заболевания, при котором один из пары был болен, а другой оставался здоров. Этот факт заставил предположить, что «физические» нарушения генома не являются единственным детерминантом клинического проявления (Simo-Riudalbas L., Esteller M. 2014; Pfeifer G.P., 2018). Более 40 лет назад был определен термин эпигенетика (Pfeifer G.P. 2018) и показана важная роль эпигенетической регуляции экспрессии генов, как фактора сохранения гомеостаза организма и геномной стабильности. В частности, механизму метилирования ДНК, как важному процессу активации или подавления генов и их путей, нарушения в котором могут привести к развитию заболевания, в частности рака, отводится роль как критического фактора эпигенетической регуляции экспрессии генов. Таким образом система эпигенетических модификаций представляет собой комплекс механизмов, направленных на регуляцию генома, но не затрагивающих его структуру. В систему эпигенетической регуляции кроме метилирования ДНК также входят модификации гистонов и мРНК (Рис.2). Ниже подробно рассматривается роль метилирования ДНК, как важного фактора эпигенетической регуляции.

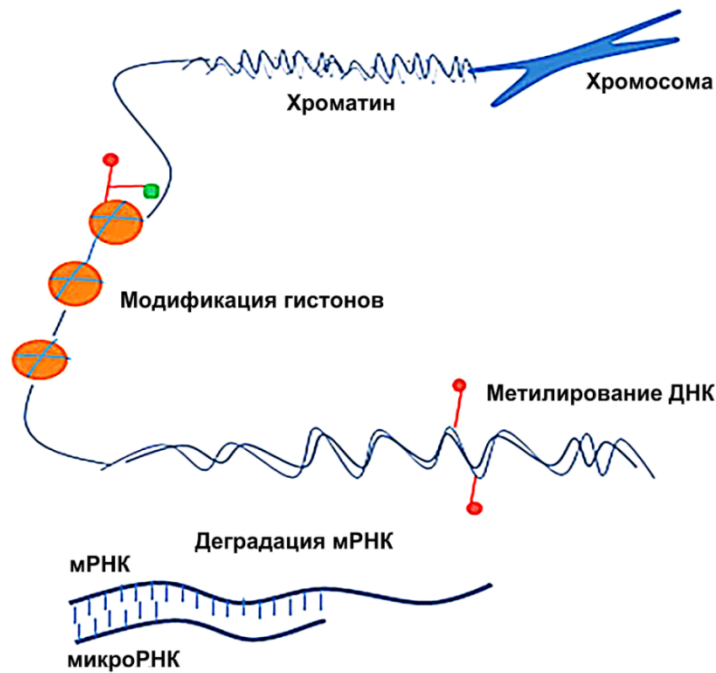


Рисунок 2. Система эпигенетической регуляции. Взято из (Zhang L. et al., 2020) с модификацией авторов.

1.2.1. Метилирование ДНК

Одним из наиболее важных и естественных системных процессов регуляции экспрессии генов, обеспечивающих поддержание стабильности всех клеточных процессов, как уже упоминалось выше, является метилирование ДНК CpG островков в промоторных областях генов (Pfeifer G.P. et al., 2018). Данный процесс имеет ключевое значение для образования опухолей разных локализаций, в том числе и для образования рака лёгкого. В нормальной клетке такой вариант метилирования рассматривается как ковалентная модификация ДНК, при которой остаток цитозина в составе CpG-динуклеотида связывается с CH_3 -радикалом в положении C^5 пиримидинового кольца (Рис.3). Данный механизм является основной эндогенной модификацией ДНК у млекопитающих (Weisenberger D.J. et al., 2022), в которой главную роль играют ДНК-метилтрансферазы (*DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B*), которые переносят CH_3 -группу с S-аденозил-L-метионина (SAM) (Gujar H. et al., 2019).

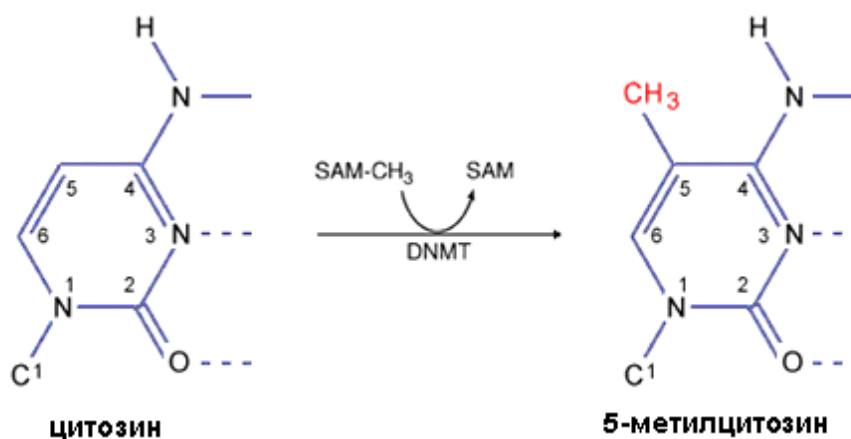


Рисунок 3. Метилирование цитозина в положении C5 пиримидинового кольца

Важно отметить, что метилирование не приводит к изменению последовательности нуклеотидов в генах, и потому является полностью обратимым процессом.

Несмотря на стабильность эпигенома клетки, деметилирование у млекопитающих может происходить разными способами. В одном случае, в процессе репликации ДНК (т.н. пассивное деметилирование) когда механизм поддержания метилирования не запускается, происходит снятие метильного радикала с 5мС. Другой процесс известен как активное деметилирование. Он основан на механизме повторного окисления с помощью ТЕТ белков. В результате этого процесса образуются 5-гидроксиметил-, 5-формил- и 5-карбоксилцитозин. Затем альтернативно включаются механизмы репликации и разрывы, обусловленные тимин ДНК-гидролазой (TDG) с последующей эксцизионной репарацией, приводящей к исходному состоянию ДНК до эпигенетической модификации (Грин И.Р. и др., 2016).

В онкологии понимание анатомии процесса aberrantного метилирования крайне важно. При злокачественной трансформации наблюдается деметилирование прото-онкогенов и метилирование генов супрессоров опухолевого роста. Чаще всего процесс деметилирования носит глобальный характер, особенно на поздних стадиях, а метилирование чаще всего тканеспецифично (Portela A. et al, 2010). Подавление экспрессии генов

может посредством метилирования может происходить с помощью различных путей. В частности, ДНК, подвергшаяся метилированию, становится мишенью для белков метил-CpG-связывающего домена (MBD). Члены этого семейства, в свою очередь, создают комплексы, имеющие сродство к метилированным сайтам и подвергающие гистоны модификации, а также хроматин ремоделированию. Также в результате метилирования блокируется транскрипция (Parry L., Clarke A.R. 2011; Ginder G.D et al., 2018). С другой стороны, участки CpG-островков, не подвергшиеся метилированию имеют хроматин в форме, благоприятной для экспрессии генов (Thomson J.P. et al., 2010).

Следует отметить, что метилирование ДНК происходит не только в участках CpG островков (Рис. 4а). Существует термин «берег CpG острова», относящийся к областям с более низкой плотностью CpG пар. Эти области лежат в непосредственной близости (~ 2 т.п.н.) от CpG островков. Термин был придуман недавно. Метилирование на этих «берегах» тесно связано с инактивацией транскрипции (Рис. 4б). Существует предположение, что большая часть тканеспецифического метилирования ДНК происходит не в области CpG островков, а как раз по «берегам» (Suzuki H. et al., 2012).

Также метилирование ДНК может осуществляться внутри гена. В этом случае оно не связано с активацией транскрипции, а выполняет регуляторные функции (Рис. 4в). Метилирование внутри генов является обычным явлением для генов, которые экспрессируются постоянно, во всех клетках и задействованы в многих клеточных процессах. Предположительно это может быть связано с эффективностью элонгации и предотвращением ложных инициаций транскрипции (Wang Q. et al., 2022).

Метилирование ДНК связано не только с регуляцией транскрипции генов. Значительная часть сильно метилированных CpG областей охватывает районы повторяющихся элементов (Рис. 4г). Это метилирование ДНК необходимо для защиты целостности хромосомы, что достигается за счет предотвращения реактивации «внутрипаразитарных» последовательностей,

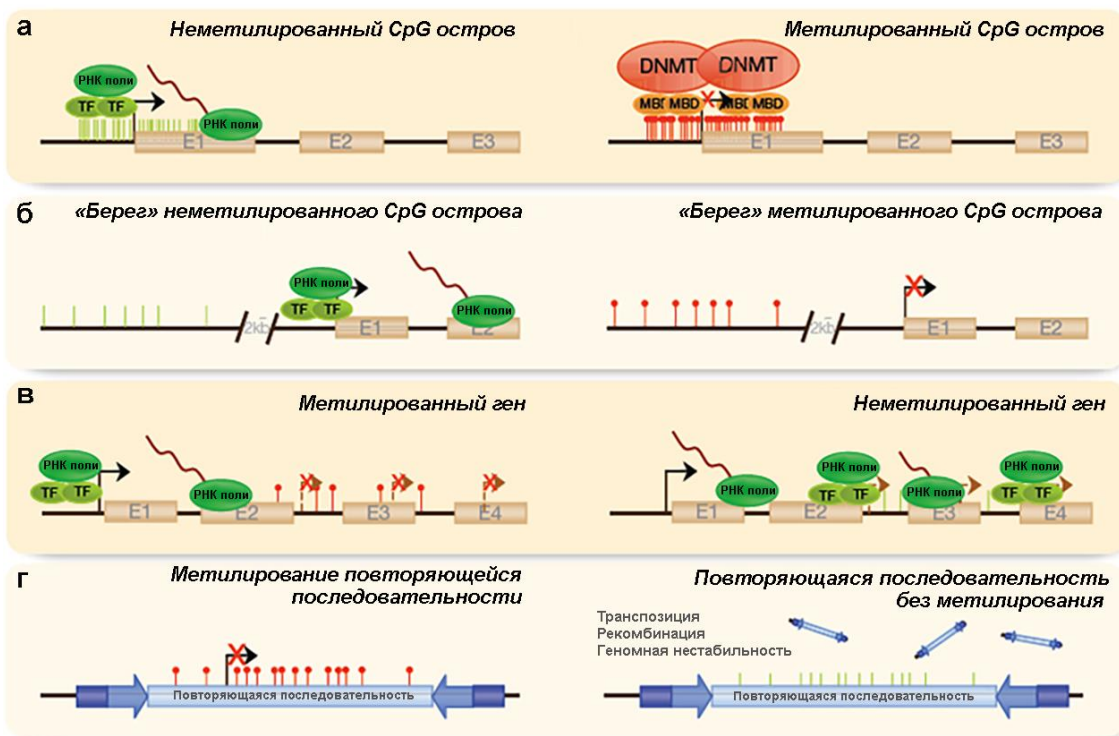


Рис. 4. Области метилирования ДНК. Метилирование ДНК может происходить в различных областях генома. Нарушение данного процесса может приводить к развитию патологии. Левый столбец посвящен нормальному сценарию, тогда как правый – отражает патологические процессы которые вызывают хромосомную нестабильность, транслокации и другие нарушения генной структуры (Pappalardo X.G, Barra V. 2021).

Следует отметить, что отмечено значительное влияние метилирования ДНК и нарушения регуляции экспрессии генов с помощью миРНК как независимо, так и в комбинации на патогенез рака лёгких (Langevin S.M. et al., 2015; Duruisseaux M, Esteller M. 2018).

Таким образом ещё одним эпигенетическим фактором, который также играет роль в патогенезе опухолей разных локализаций является миРНК, осуществляющие свою регуляцию на разных уровнях клеточного метаболизма.

1.2.2. МикроРНК и рак

МиРНК относятся к классу малых некодирующих РНК длиной 19-24 нуклеотида. Основная их функция в клетке – посттранскрипционная регуляция экспрессии белоккодирующих генов-мишеней (Логинов В.И. и др.,

2015; Комина А.В. и др., 2020). В норме миРНК участвуют в процессах пролиферации, дифференцировки и гибели клетки, и характеризуются выраженной специфичностью в отношении места и времени действия (Bartel D.P. 2009). 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).

У каждого белоккодирующего гена в 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) есть комплементарные последовательности для связывания со своей миРНК, для которой он является геном-мишенью. На уровне мРНК-мишеней, в зависимости от комплементарного связывания со своей мишенью взаимодействующие миРНК осуществляют или деградацию мРНК-мишени (при полной комплементарности), или блокировку трансляции (при частичной комплементарности). Ярким примером функциональной активности миРНК является отщепление от мРНК поли(А)-«хвоста» (Клаг У.С. и др., 2021).

Необходимо отметить, что одна и та же миРНК может воздействовать со всеми мРНК, имеющими в своей последовательности соответствующие сайты связывания. Кроме того, поскольку для связывания не требуется полной комплементарности, эти сайты могут иметь слегка различающиеся последовательности. В итоге, регуляция экспрессии генов с помощью миРНК – это уникальный, универсальный, адаптивный механизм поддержания клеточного гомеостаза. Следует отметить, что в организме человека до 60 % генов являются мишенями миРНК (Аушев В.Н., 2015). Поэтому, нарушение в механизмах миРНК регуляции является таким же важным фактором патогенеза опухоли, как и метилирование (Семина Е.В. и др., 2021). Следует отметить, что миРНК при онкологии значительно отличаются по своей роли в патогенезе опухоли. Одна часть миРНК в патогенезе опухоли выступает как онкогены, подавляя экспрессию белок-кодирующих генов-супрессоров опухолевого роста. Иные – наоборот блокируют активность онкогенов. Также есть и такие миРНК, которые в разных тканях могут проявлять различные свойства (Szymczyk A. et al., 2018; Семина Е.В. и др., 2021).

Согласно проведенным исследованиям миРНК обнаруживаются в геноме человека главным образом в виде кластерных структур. Общее количество генов миРНК в геноме составляет около 36% (Логинов В.И. и др., 2015). К таковым, например, можно отнести кластер miR-17-92, который при опухолях легкого подвергается гиперэкспрессии и, таким образом, проявляет свойства онкогена. Важно, что все гены миРНК распределены в клетке и могут находиться как в межгеномном, так и внутригеномном пространстве (Запорожченко И.А. и др., 2020).

Выделяют несколько стадий синтеза миРНК. Гены миРНК транскрибируются РНК полимеразой с образованием первичного предшественника миРНК – при-миРНК (Аушев В.Н. 2015). Далее в ядре под действием специального комплекса при-миРНК расщепляется с образованием пре-миРНК. Далее с помощью транспортного комплекса пре-миРНК переносится в цитоплазму, где под действием дополнительных факторов подвергается модификации с образованием миРНК дуплекса, который затем расплетается, и зрелая миРНК длиной около 22 нуклеотидов включается в РНК-индуцируемый комплекс выключения генов (RISC-комплекс). Важно отметить, что ключевым этапом при выборе гена-мишени является узнавание в последовательности мРНК нуклеотидов комплементарных 6-8 нуклеотидам в миРНК (Тармаев А.А., Бейлерли О.А. 2019).

Важно отметить, что для любого типа рака одновременно изменяется уровень экспрессии нескольких миРНК. При этом, если уровень экспрессии миРНК в опухоли увеличивается, то миРНК функционирует как онкоген, если же уровень экспрессии миРНК снижается в опухоли, то такая миРНК считается супрессором опухолевого роста. Тем не менее, по мере развития опухоли, уровень экспрессии миРНК может меняться (Zagryazhskaya A, Zhivotovsky B. 2014; Wadowska K. et al., 2020).

Для многих миРНК, как уже отмечалось выше, характерна двойственность в функциональной активности в зависимости от типа злокачественной опухоли. К примеру, miR-29 проявляет онкогенные свойства

при раке молочной железы, но действует как ген-супрессор при раке легкого (Alizadeh M. et al., 2019). В каждой злокачественной опухоли, существует свой, индивидуальный набор экспрессирующихся миРНК, но при этом, можно увидеть несколько миРНК, которые наиболее часто встречаются при онкологии разных локализаций.

Одной из возможных причин разнообразия профилей экспрессии миРНК в опухолях разных локализаций, является aberrантное метилирование промоторных CpG-островков генов миРНК. Этот процесс, затрагивающий гены как супрессорных, так и онкогенных миРНК (Логинов В.И. и др., 2015). Так, подавление экспрессии генов *MIR34A* и *MIR199A* посредством гиперметилирования значительно повышает уровень экспрессии мРНК гена *AXL* и, как следствие, увеличивается количество одноимённого белка Axl, опосредующего инвазию, метастазирование и ангиогенез в эпителиальных опухолях (Li S., et al., 2021; Meng W., et al., 2022).

Кроме того, по сравнению с БКГ, в генах миРНК можно увидеть более высокую частоту метилирования промоторных CpG-островков, в результате чего, их можно рассматривать как дополнительные маркеры опухоли. Следует подчеркнуть, что некоторые из эпигенетически регулируемых генов миРНК обнаружены только в одном виде рака, что подкрепляет возможность их потенциального использования в качестве диагностического инструмента (Piletič K., Kunej T. 2016).

В настоящей работе рассмотрен ряд миРНК, aberrантное метилирование которых связано с развитием онкологии разной локализации, в том числе и РЛ.

Семейство генов *MIR124*. Данная миРНК характеризуется высокой консервативностью и кодируется тремя гомологичными генами, расположенными на разных хромосомах: *MIR124-1* (8p23.1), *MIR124-2* (8q12.3) и *MIR124-3* (20q13.33). Показано участие miR-124 в возникновении и прогрессии различных видов онкологии, в том числе и при раке легкого (Braga E.A, et al., 2022). К генам-мишеням miR-124 при НМРЛ относятся: *TXNRD1*,

LHX2, *MGAT5*, *STAT3* и др., они связаны с прогрессированием заболевания, а также к ответу на лечение.

Работа Q Yang, et al. показала, что экспрессия miR-124 часто снижалась в клетках и тканях НМРЛ и отрицательно коррелировала с экспрессией *LHX2* (LIM-гомеобокс, домен 2), которая повышалась в клетках и тканях НМРЛ. При этом гиперэкспрессия miR-124 в клеточных линиях A549 и H1299 подавляла миграционные и инвазивные способности клеток (Yang Q. et al., 2017).

Стоит отметить, что miR-124 связана с устойчивостью к проведению адьювантного лечения при злокачественных новообразованиях различных локализаций, в том числе рак желудка и РМЖ (Liu Y.Y. et al., 2019; Hu D. et al., 2019, Yan G. et al., 2019).

В работе (Wang M. et al., 2017), был показан низкий уровень экспрессии miR-124 как в опухолевой ткани пациентов с НМРЛ, так и в клеточных линиях рака легкого. Увеличение уровня экспрессии miR-124 приводило к подавлению пролиферации клеток и усилению апоптоза. Показано, что одним из генов-мишеней является ген *STAT3*, который представляет собой сигнальный и транскрипционный фактор, регулирующий большое число клеточных процессов. В другой работе (Qi M.M. et al., 2019) тоже было показано, что гиперэкспрессия miR-124 заметно снижала уровень экспрессии мРНК гена *STAT3* в клеточной линии рака легкого A549, путем связывания с его 3'-нетранслируемой областью, увеличивая тем самым чувствительность клеточной линии к цисплатину и ингибировала способность клеток к инвазии и метастазированию (Zhao X. et al., 2017). Таким образом, miR-124 можно рассматривать, как будущую терапевтическую мишень для лечения НМРЛ.

Одной из основных причин подавления экспрессии miR-124, является метилирование ДНК в промоторных CpG-островках генов, кодирующих эту миРНК, в том числе и при НМРЛ (Логинов В.И. др., 2015; Kim Y.H. et al., 2017; Heller G. et al. 2018).

В работе (Kim Y.H. et al., 2017), было показано, что уровень метилирования генов семейства *MIR124* в опухоли отличался друг от друга

незначительно и составил свыше 80%. В то же время в парной условной нормальной ткани уровень метилирования находился в референсных значениях с таковыми в контроле (здоровые люди без патологии). Следует отметить, что авторы не дают оценку, является ли метилирование данных генов событием синергичным или каждый ген метилируется независимо. Также были получены убедительные результаты связи статуса метилирования с выживаемостью для каждого из генов семейства *MIR124*. В другой работе было показано, что если бы метилирование генов *MIR124-1/2/3* в опухоли можно было бы предотвратить, то прогрессирование и метастазирование опухоли было бы подавлено (Zhou Z. et al., 2019). Таким образом, метилирование генов семейства *MIR124* может быть многообещающим биомаркером чувствительности к цисплатину и являться важным селективным маркером НМРЛ и плохой выживаемости при НМРЛ.

Ген *MIR125B-1* расположен в локусе 11q24.1 и кодирует миРНК miR-125b-5p, участвующую в поддержании гомеостаза клетки (Abdollahi S. et al. 2022), для которой показано, что уровень ее экспрессии может быть, как повышен, так и понижен в зависимости от типа опухоли. Это может свидетельствовать о том, что miR-125b-5p является тканеспецифичной миРНК (Banzhaf-Strathmann J. and Edbauer D., 2014). MiR-125b участвует в регуляции таких процессов как дифференцировки клеток, программируемая клеточная гибель. Гиперэкспрессия miR-125b подавляет экспрессию мРНК гена-мишени *S1PR1*, а также пролиферацию, инвазию и миграцию клеток НМРЛ (Peng B. et al., 2021). В ряде работ зарубежных авторов было отмечено, что после проведения полихимиотерапии (ПХТ) у больных НМРЛ зафиксирован повышенный уровень miR-125b в плазме крови по сравнению с больными, которые не получали ПХТ. Вышеизложенное говорит о том, что циркулирующая miR-125b может быть прогностическим маркером в ответе на лечение (Wang Y. et al., 2017).

Генами-мишенями miR-125b являются – *BAK1*, *MCL1*, *BCL2*, *SIRT* (апоптоз-ассоциированные гены), *TP53INP1*, *MMP13*, *KLC2* (гены регуляторы клеточного цикла и метастазирования) (Губенко М.С. и др., 2022).

Одним из факторов, который может приводить к изменению уровня экспрессии miR-125b, в опухолях разных локализаций, а также на разных этапах онкогенеза, считают гиперметилирование ее промоторного CpG-островка (Shen J. Et al., 2015). Так при раке молочной железы было показано, что высокий уровень метилирования промоторного CpG-островка гена *MIR125B1*, связан с сильным снижением уровня экспрессии miR-125b, что, по-видимому, приводило к возникновению лимфогенного метастазирования и утяжелению течения болезни (Pronina I.V. et al. 2017). В этой же работе была показана достоверная отрицательная корреляция между уровнями экспрессии мРНК апоптоз ассоциированного гена *DAPK1* и miR-125b, что указывает на регуляторную функцию этой миРНК в процессах программируемой клеточной гибели. В другой работе (Рыков С.В. и др. 2013) выполненной на малой выборке образцов НМРЛ было показано, что частота метилирования гена *MIR125B1* коррелируют с прогрессией – клинической стадией и лимфогенным метастазированием.

Таким образом, гиперметилирование ДНК может быть вовлечено в инактивацию экспрессии miR-125b, и может функционировать как возможный потенциально независимый биомаркер течения и клинического исхода при раке яичников, молочной железы, легкого, толстой кишки (Zuberi M. et al., 2016; Chen H., Xu Z. 2015).

МикроРНК miR-127 (ген *MIR127*, *14q32.2*) изначально обнаружена в эмбрионах человека и мыши, где она имеет высокий уровень экспрессии. Анализ экспрессии показал важную роль данной миРНК в путях органо- и онкогенеза, в том числе и раке легкого (Shi L. et al., 2017).

Отмечается, что гиперэкспрессия miR-127 приводит к блокированию клеточной пролиферации, клеточного цикла, клеточной миграции и инвазии в клеточных линиях таких локализаций, как РМЖ, рак желудка, рак

предстательной железы, глиобластома. Происходит это через взаимодействие с онкогенами *Wnt7a*, *BCL6* (Chen J. et al., 2019; Wang L. et al., 2019).

В работе (Shi L. et al., 2017) было показано, что высокий уровень экспрессии *miR-127* характерен для аденокарциномы легкого и коррелировал с плохим прогнозом.

При анализе зарубежной и отечественной литературы за последние 20 лет было выявлено, очень мало работ об участии аномального метилирования промоторного CpG-островка гена *MIR127* в регуляцию экспрессии *miR-127* в опухолях разных локализаций. Так при раке молочной железы и яичников показано, что увеличение уровня метилирования гена *MIR127* связано с подавлением *miR-127* экспрессии (Филиппова Е.А. и др., 2021; Loginov V.I. et al., 2018). В другом исследовании, проведенном на раке легкого, был показан высокий уровень метилирования не только в опухоли, но и в гистологически нормальной прилежащей ткани легкого. Более того, высокий уровень метилирования был связан с прогрессией НМРЛ, а также низкой выживаемостью и плохим прогнозом (Tan W. et al., 2015). Таким образом, метилирование гена *MIR127* может быть многообещающим биомаркером диагностики и прогноза выживаемости при НМРЛ.

Ген *MIR129-2* является внутригенным локусом, расположенным в районе 11p11.2 (ген-хозяин — *HSD17B12*). Уменьшение экспрессии *miR-129* зафиксировано при онкологии разных локализациях, в том числе и при аденокарциноме легкого (Xiao Y. et al., 2019). Стоит отметить, что при ретинобластоме происходит увеличение экспрессии *miR-129* (Thériault B.L. et al., 2014).

На сегодняшний день, механизм метастазирования и увеличенной инвазии при НМРЛ, остается недостаточно изученным. В работе, выполненной на клеточной линии рака легкого A549, было показано, что механизмом блокирования инвазии и миграции клеток является ингибирование экспрессии мРНК гена-мишени *SOX4* под действием *miR-129* (Bin C. et al., 2018). В другой работе, было показано что мишенью для *miR-129*

может быть мРНК гена-мишени *YWHAB*, который вовлечен во множество ключевых клеточных процессов, в частности, в пролиферацию и апоптоз при НМРЛ (Xu C. et al., 2020). Уровень экспрессии этого гена при НМРЛ оказался значительно повышен, тогда как уровень экспрессии miR-129 был низким. Анализ клеточных линий подтвердил прямую связь между мРНК и геном-мишенью, а также тот факт, что нормально экспрессирующаяся miR-129 усиливает апоптоз (Xu C. et al., 2020).

Метилирование гена *MIR129-2* обнаружено в опухолях разных локализаций и коррелировало с плохим прогнозом, в том числе и при раке легкого (Pronina I.V. et al., 2016; Heller G. et al., 2018). Это может быть связано с гиперэкспрессией ее генов-мишеней *SOX4*, *TWIST1* и *ZEB1* (Zhou W. et al., 2022; Silveira D.A. et al., 2020).

Таким образом, miR-129 выполняет роль супрессора опухолевого роста и способна подавлять пролиферацию, миграцию и инвазию через соответствующие регуляторные пути, а метилирование гена *MIR129-2* может выступать маркером диагностики и прогноза выживаемости при НМРЛ.

Ген *MIR137* расположена в области 1p21.3, имеет CpG-островок, включающий в себя как промоторную область, так и сам ген.

Снижение уровня экспрессии miR-137 показано в опухолях разных локализаций, в том числе и при НМРЛ. В одних работах показано, что восстановление уровня экспрессии miR-137 индуцирует блокировку клеточного цикла (Zhu X. et al., 2013), в других, приводит к активации апоптоза (Bi Y. et al., 2014), в-третьих, подавляет инвазию и миграцию клеток НМРЛ (Zhang B. et al., 2015). Так же было показано, что низкий уровень экспрессии miR-137 при НМРЛ коррелировал с тяжестью опухолевого процесса, и плохим прогнозом у пациентов с этим злокачественным новообразованием (Zhang B. et al., 2015; Nuzzo S. et al., 2019).

Согласно ряду исследований, в опухолевой ткани разных локализаций, например при раке головы и шеи, толстой кишки, шейки матки, молочной железы, глиобластоме, основным регулятором экспрессии miR-137 является

абберантное метилирование расположенного рядом CpG-островка (Celesnik H. et al., 2021; Kashani E. et al., 2019; Zhang W. et al., 2018; Логинов В.И. и др., 2016). Обработка гиперметилированных клеток рака шейки матки деметилирующими агентами приводила к активации экспрессии miR-137. Кроме того, снятие метилирование с гена *MIR137* подавляло пролиферацию раковых клеток и образований колоний *in vitro* (Zhang W. et al., 2018)

В работе (Min L. et al., 2018) была получена значимая отрицательная корреляция между экспрессией miR-137 и метилированием промотора гена *MIR137* в тканях НМРЛ ($R_s = -0,343$; $p = 0,01$). Курение, метастазирование в лимфатические узлы и тяжелая клиническая стадия (III-IV) были связаны со значительно более низким уровнем экспрессии miR-137 и высоким уровнем метилирования. Так же, высокие уровни метилирования гена *MIR137* были связаны с худшей безрецидивной выживаемостью ($p = 0,034$), но не были связаны с общей выживаемостью. В работе (Kang N. et al., 2015) выполненной на клеточных линиях НМРЛ, экспрессия miR-137 была реактивирована воздействием деметилирующих агентов. В образцах НМРЛ был показан высокий уровень метилирования гена *MIR137* в опухолевой ткани, по сравнению с прилежащей гистологически нормальной тканью, что дополнительно было подтверждено бисульфитным секвенированием. Уровень экспрессии miR-137 значительно подавлен в опухоли легкого, что обратно коррелировало с уровнем метилирования гена *MIR137* (Kang N. et al., 2015). Ранее, было показано метилирование четырех генов мРНК (*MIR125B-1*, *137*, *375*, *1258*) у пациентов с НМРЛ с частотой 56%, 31%, 56% и 36%, соответственно. (Рыков С.В. и др., 2013).

Таким образом, подавление экспрессии miR-137 при раке легкого связано с высоким уровнем метилирования промотора гена, ее кодирующего. В дальнейшем, эпигенетическая оценка *MIR137* может свидетельствовать о благоприятном прогнозе и способствовать разработке новых терапевтических препаратов.

Ген микроРНК *MIR375* расположен в хромосомной области 2q35 и практически полностью лежит в протяженном (около 3000 п.н.) CpG-островке.

Информация по изменению экспрессии гена *MIR375* в опухолях разных локализаций противоречива. Так в работе (Alam K.J. et al., 2017), показано снижение уровня экспрессии miR-375 в опухолях толстой кишки. При этом, в ER α -позитивных клеточных линиях РМЖ отмечен высокий уровень ее экспрессии, который был связан с локальным деметилированием ДНК, причем подавление экспрессии miR-375 приводило к приостановке пролиферации (Liu Y. et al., 2022). В работе (Gan T.Q. et al., 2017) было показано, что экспрессия miR-375 увеличивается при аденокарциноме и мелкоклеточном раке легкого. Более того, были выявлены три гена-мишени *FGF2*, *PAX6*, и *RHOJ*, уровень экспрессии которых был значительно подавлен в опухоли по сравнению с нормальной тканью. Таким образом, по результатам исследования было высказано предположение, что данная миРНК может считаться фактором прогрессии опухоли. В то же время в работе (Cheng L. et al., 2017) было показано что, при НМРЛ наблюдается снижение экспрессии miR-375, а ее восстановление ингибирует пролиферацию клеток НМРЛ путем запуска в них апоптоза.

Динамические изменения в уровне экспрессии miR-375 регулируются эпигенетическими механизмами, главным образом метилированием промоторного CpG-островка и самого гена *MIR375*. Эта закономерность выявлена при исследовании РМЖ. Показано, что гиперметилирование *MIR375* статистически значимо связано со снижением экспрессии этого гена в опухоли в сравнении с прилегающей неизменённой тканью (Филиппова Е.А. и др., 2021). Высокий уровень метилирования гена *MIR375* был обнаружен в тканях и клеточных линиях рака яичников, при этом экспрессия miR-375 снижалась по мере увеличения метилирования ее промотора. Деметилирование в клетках опухоли вернуло экспрессию miR-375 к нормальному уровню с очевидным снижением клеточной инвазии, миграции и жизнеспособности клеток, а также усилению апоптоза (Shu J. et al., 2021). В другой работе (Varghese V.K. et al.,

2019), выполненной на клеточных линиях SiHa, HeLa и CaSki рака шейки матки, было показано что обработка деметилирующим агентом реактивировала экспрессию miR-375 и miR-196a-1 в клетках опухоли, а искусственное метилирование *in vitro* с помощью M. SssI подтвердило, что *MIR375* и *MIR196A-1* являются миРНК, регулируемые метилированием ($p < 0,05$). Уровни экспрессии miR-375 и miR-196a-1 отрицательно коррелировали с уровнями метилирования в клинических образцах. Авторы в своей работе утверждают, что miR-375 и miR-196a-1 представляют собой миРНК, регулируемые метилированием ДНК, нарушение регуляции которых может способствовать патофизиологии рака шейки матки (Varghese V.K. et al., 2019).

Работ по анализу уровня метилирования промоторного района гена *MIR375* в базе PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) по формуле поиска «methylation AND cancer AND lung AND mir375» найдено не было кроме исследований, проведенных в нашей лаборатории (Рыков С.В. и др., 2013; Губенко М.С. и др., 2022)

Таким образом, метилирование *MIR375* возможно может быть использованов качестве диагностического и прогностического биомаркера при НМРЛ.

Согласно базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/442907>) ген *MIR339* расположен в геномном регионе 7p22.3. Анализ результатов мировых исследований показал супрессорный характер данной миРНК при опухолях различных локализаций, например РМЖ, НМРЛ и гепатоцеллюлярном раке. Так в работе (Liang Y. et al., 2021) выполненной на 157 парных образцах РМЖ было показано снижение уровня экспрессии miR-339 в опухолевых образцах по сравнению нормальной тканью. Похожая ситуация наблюдается при гепатоцеллюлярном раке (Zeng H. et al., 2019). Авторами было показано, что количество miR-339 значительно снижено в первичных тканях гепатоцеллюлярного рака. Сверхэкспрессия miR-339 в

клетках опухоли заметно подавляла пролиферацию и инвазию и индуцировала апоптоз.

Для НМРЛ зарубежными авторами получены похожие данные и найдены гены-мишени, нарушение в регуляции которых приводит к возникновению этого вида патологии. Один из них – ген с выраженными онкогенными свойствами, участвующий в активации пролиферации клеток – ген *SKP2* (Белок 2, ассоциированный с киназой S-фазы) (Ren H. et al., 2018). Показана отрицательная корреляция miR-339 с мРНК *Skp2* в первичных опухолях НМРЛ, при этом инактивация miR-339 способствовала пролиферации клеток рака легкого. Прогрессия рака легкого тесно связана с подавлением апоптоза, а точнее одной из его форм – ферроптоза. В работе (Zhang N. et al., 2022) была выявлена отрицательная корреляция между экспрессией miR-339 и мРНК гена *SLC7A11*, и то, что инактивация miR-339 приводила к увеличению экспрессии мРНК гена *SLC7A11* и ослабляло ферроптоз, который представляет собой важный механизм канцерогенеза для метастазирования аденокарциномы легкого. В работах (Li P. et al., 2018; Ulivi P. et al., 2013), показано что miR-339 отрицательно связана с возникновением, развитием и метастазированием опухоли и, по-видимому, действует как супрессор опухоли при НМРЛ.

Следует отметить, что в регуляции экспрессии мРНК гена *MIR339* большая роль отведена механизмам эпигенетики и, главным образом, метилированию. Так, при исследовании рака яичников была показана обратная корреляция между уровнями метилирования и экспрессии в опухоли для данного гена. Выявленный высокий уровень метилирования приводил к инактивации гена. Это подтверждают результаты исследования патоморфологических особенностей опухоли (Loginov V.I. et al., 2022). При исследовании РМЖ была показана ассоциация высокого уровня метилирования гена *MIR339* с III-IV стадией рака, размером опухоли и лимфогенным метастазированием ($p < 0,005$) (Логинов В.И. и др., 2021). В работе (Shen B. et al., 2015) было показано что, экспрессия miR-339 снижена в

первичном очаге рака желудка, что связано с гиперметилированием гена *MIR339*, а сверхэкспрессия *miR-339* значительно подавляла пролиферацию, миграцию и инвазию, и онкогенный потенциал опухоли. Все эти изменения в экспрессии были связаны с метилированием ее промоторного района.

Таким образом, исходя из вышеперечисленного метилирование *MIR339* является важнейшей компонентой в регуляции экспрессии *miR-339* при различных формах рака, возможно и при НМРЛ.

Ген *MIR1258* локализован расположена в первом интроне своего гена-хозяина *ZNF385B* (белок цинкового пальца 385B) на хромосоме 2q31.3 и играет ключевую роль в регуляции различных процессов протекающих в норме и патологии в организме человека, например: в функционировании кишечного барьера, бронхолегочной дисплазии, дифференцировке бурого жира, возникновении и прогрессировании рака (Qian M. et al., 2022).

Анализ результатов международных исследований позволяет характеризовать ген *MIR1258* как ген-супрессор опухолей, а кодируемая им миРНК *miR-1258* имеет значительно сниженный уровень экспрессии в опухолевой ткани и клеточных линиях разных локализаций, в том числе и при раке легкого (Jiang W. et al., 2018). *MiR-1258* при раке вовлечена в регуляцию клеточного цикла, апоптоза, миграции и инвазии, а также в блокирование эпителиально-мезенхимального перехода (Qian M. et al., 2022). Так, при исследовании рака толстой кишки получены убедительные результаты снижения уровня экспрессии данной миРНК в опухоли. При этом искусственное увеличение уровня экспрессии *miR-1258* в клеточных линиях рака толстой кишки приводило к остановке пролиферации клеток через нормализацию клеточного цикла в фазе G₀/G₁ (Zhang Z. et al., 2018; Hwang J.S. et al., 2019). В клетках РМЖ и рака шейки матки экспрессия *miR-1258* снижена, тем самым нарушается процесс подавления экспрессии мРНК гена *E2F1* (Zhao X., 2020; Peng X. et al., 2020). В опухолевых тканях и клеточных линиях НМРЛ *miR-1258* тоже имеет сниженный уровень экспрессии. При реактивации экспрессии подавляет прогрессирование НМРЛ, индуцирует

клеточное старение, апоптоз, снижает жизнеспособность опухолевых клеток через ось GRB2/Ras/Erk (Jiang W. et al., 2018). Так же при НМПЛ была показана обратная корреляция экспрессии miR-1258 с экспрессией мРНК гена гепараназы (HPSE). Следует отметить, что высокий уровень экспрессии miR-1258 подавлял экспрессию гепараназы, миграцию опухолевых клеток и прогрессию рака (Liu H. et al., 2012).

Тем не менее, механизм нарушения регуляции miR-1258 при НМПЛ и других форм рака еще до конца не ясен.

Одним из возможных механизмов дерегуляции экспрессии miR-1258 является метилирование гена *MIR1258*. Так в работе (Wang L.Q. et al., 2020) восстановленная сверхэкспрессия *miR-1258* в полностью метилированных клетках миеломы приводила к снижению клеточной пролиферации и усилению апоптоза, следовательно, являлась супрессором опухоли. В другой работе был продемонстрирован высокий уровень метилирования гена *MIR1258* при раке простаты, что дало повод автором утверждать, что данный маркер может рассматриваться как очень хороший маркер диагностики этого вида рака (Torres-Ferreira J. et al., 2017). В ряде работ нашей лаборатории показано убедительное влияние уровня метилирования гена *MIR1258* на экспрессию miR-1258 при раке разной локализации. Так, при изучении рака молочной железы были не только получены убедительные доказательства важной роли гиперметилирования в патогенезе опухоли, а также связи с прогрессией заболевания, но и составлена панель маркеров для возможного клинического генетического анализа (Логинов В.И. и др., 2021). В работе, выполненной около 10 лет назад на парных образцах рака легкого, было показано достоверное различие частот метилирования гена *MIR1258* в ДНК опухолей и нормальных тканей ($p \leq 0.05$). В тканях легких от 20 доноров без рака в анамнезе этот ген не был метилирован (Рыков С.В. и др., 2013).

Таким образом, исходя из вышеперечисленного *miR-1258* представляет собой миРНК-супрессор опухолей, и метилирование гена *MIR1258* может

быть использовано в качестве диагностического и прогностического биомаркера при НМРЛ.

1.3. Опухоль-ассоциированные гены, участвующие в путях запрограммированной клеточной гибели

Следует отметить, что механизмы образования и прогрессии опухоли связаны с нарушением динамической регуляции клеточных процессов протекающих в нормальных тканях, в том числе и ткани легкого, и обусловлены как генетическими, так и эпигенетическими факторами, которые играют критическую роль в регуляции экспрессии генов-супрессоров опухоли и онкогенов (Morris L.G. et al., 2015). Одним из таких процессов является программа клеточной гибели (ПКГ). Она подразумевает последовательную активацию ряда генов, которые кодируют белки, запускающие процесс гибели клетки. По данным базы GeneCards (<https://www.genecards.org/> Version 5.16 (Updated: May 19, 2023)) при формуле поиска «Programmed cell death (Pathways)» в ПКГ во всех ее проявлениях в клетке участвует около 400 генов.

В настоящее время известно более 10 тесно связанных между собой программ гибели клеток и которые можно разделить на внешние, которые запускаются сигналами извне клетки, и внутренние, вызванные нарушениями в функционировании клеток (Galluzzi L., et al. 2018). С точки зрения морфологии можно выделить три основных вида ПКГ – апоптоз, некроз и аутофагия. Аутофагия – это нормальный физиологический процесс, который всегда присутствует в клетках. При этом типе клеточной гибели все органеллы клетки перевариваются, оставляя лишь клеточный мусор, который затем поглощается макрофагами (Шляпина В.Л. и др., 2021; Eskelinen E.L., 2019). Другой важной формой клеточной гибели, которая может принимать участие в развитии злокачественных новообразований – это некроз. В отличие от апоптоза и аутофагии, в процессе некроза клеточное содержимое выходит в околклеточный матрикс (Савицкая М.А., Онищенко Г.Е. 2015) провоцируя

опухолевое перерождение эпителиальных клеток и стромы (Греков И.С., Кондратюк Р.Б. 2020).

В тоже время, апоптоз направлен на гибель клеток с минимальным повреждением окружающих тканей. Его основная физиологическая функция состоит в поддержании равновесия между процессами пролиферации и гибели клеток и в его основе лежит разрушение ядра клетки в ответ на внутренние или внешние сигналы. Внутренний апоптоз запускают разнообразные изменения внутренней среды клетки, например, стресс эндоплазматического ретикулума, активные формы кислорода, нарушения репликации ДНК и др. Критический этап внутреннего апоптоза — разрушение мембран митохондрий которая контролируется различными белками семейства BCL2. В результате в цитозоль клетки выходят проапоптотические факторы, которые в обычное время находятся в межмембранном пространстве митохондрий (Galluzzi L. et al., 2018). Ключевую роль в запуске внешнего апоптоза играют: рецепторы смерти, которые активируются при связывании с лигандом, а также рецепторы, которые активируются, когда концентрация их лиганда опускается ниже порогового значения. Когда рецептор смерти активируется, у его внутриклеточной части собирается особый белковый комплекс — DISC (от англ. death-inducing silencing complex), в состав которого входит белок DAPK1 (Chen H.Y. et al., 2014).

Первое упоминание о данном белке и гене, его кодирующем встречается в середине девяностых гг. (Deiss L.P. et al., 1995). Ген **DAPK1** локализован в районе 9q21.33 и представляет собой белок с молекулярной массой 160 кДа, состоящий из 1430 аминокислот, объединенных в протеинкиназный домен, кальций-кальмодулин связывающий сайт, область связывания с цитоскелетом клетки и домен смерти (Singh P. et al., 2016). Последующие исследования показали, что активация и/или сверхэкспрессия DAPK1 способствует каспазозависимому или - независимому апоптозу, аутофагии, некрозу и апоптозоподобной гибели клеток (Bialik S., Kimchi A. 2006; Wang Q., et al., 2021). Помимо роли, способствующей гибели клеток, DAPK1 играет важную

роль в росте клеток, онкогенезе, воспалении (Bialik S., Kimchi A. 2006). Так на ранней стадии рака *DAPK1* может подавлять рост опухоли и метастазирования за счет усиления апоптоза, а на поздних стадиях – может ингибировать движение и адгезию клеток, вмешиваясь в работу белков интегринов (Kuo J.C. et al., 2006; Xie J.Y. et al., 2017).

Гиперметилирование CpG-островка в промоторной области гена *DAPK1* является одним из важных способов инактивации этого гена-супрессора опухоли, который может способствовать канцерогенезу опухолей разной локализации, в том числе и рака легких. Ранее было показано, что экспрессия гена-супрессора *DAPK1* подавляется гиперметилированием его промотора при колоректальном раке и В-клеточной лимфоме (Ozyerli-Goknar E., Bagci-Onder T. 2021), что делает раковые клетки менее чувствительными к TNF-индуцированному апоптозу. Однако клинико-патологическое значение гиперметилирования промотора гена *DAPK1* при НМРЛ остается неясным. В работах (Li Y. et al., 2015; Huang X. et al., 2018) было показано, что частота метилирования гена *DAPK1* была увеличена при НМРЛ, по сравнению с нормальной тканью легкого ($p < 0,05$) и плазмой крови. В плазме крови здоровых доноров метилирование этого гена выявлено не было (Huang X. et al., 2018). Однако при сравнении уровня гиперметилирования промотора гена *DAPK1* при аденокарциноме и плоскоклеточном раке в одних работах не было обнаружено существенной разницы (Zhang Y. et al., 2018), в других было показано что метилирование гена в значительной степени связано с плоскоклеточным раком ($p = 0,04$) и курением ($p = 0,03$) (Chen Z. et al., 2022). Также показана статистически значимо высокая частота метилирования *DAPK1* на поздних стадиях и образцах с метастазами у пациентов с НМРЛ (Yang X.Y. et al., 2018). И наконец, было показано, что 5-летняя выживаемость была ниже в группе пациентов с НМРЛ с высокой частотой метилирования *DAPK1* по сравнению с группой пациентов с неметилированным *DAPK1* (Yang X.Y. et al., 2018). Таким образом, гиперметилирование промотора *DAPK1*

возможно является потенциальным биомаркером для прогнозирования неблагоприятного прогноза у пациентов с НМРЛ.

Хотя гиперметилирование промоторного CpG-островок гена *DAPK1* часто указывается как основной механизм инактивации этого гена при раке, белок DAPK1 все же может экспрессироваться и в присутствии гиперметилирования в первичных тканях и клеточных линиях. Неоднократно сообщалось и о потере экспрессии DAPK1 в отсутствие гиперметилирования его промотора, что указывает на существование дополнительных уровней регуляции DAPK1 в опухолях, включая посттранскрипционную регуляцию DAPK1. В небольшом количестве случаев сообщалось о гомозиготных и аллельных делециях, точечных мутациях и однонуклеотидных полиморфизмах в гене *DAPK1* (Chen H.Y., 2014; Benderska N, et al., 2014).

Одним из таких дополнительных уровней регуляции может выступать взаимодействие с микроРНК (Michlewski G., Saceres J. F. 2019). Так показано, что микроРНК miR-103 и miR-107 связываются с 3'НТО мРНК гена *DAPK1* и подавляют экспрессию pDAPK1, тем самым инактивируя интегрин В1, что приводит к увеличению подвижности клеток и снижению адгезии клеток к матриксу при колоректальном раке (Chen H.Y. 2012). В других работах показано взаимодействие микроРНК miR-191-5p и miR-141-3p с геном *DAPK1* при раке молочной железы и раке шейки матки (Cui Z. et al., 2018; Majed S.O., 2022).

Следует отметить, что данных о взаимодействии мРНК гена *DAPK1* с микроРНК при НМРЛ не выявлено.

Белки семейства Bcl-2 участвуют во множестве процессов запрограммированной гибели клеток, главным из которых является активация внутреннего пути апоптоза. Учитывая роль апоптоза в противоопухолевой защите организма, можно предположить, что аномальные клетки могут использовать нарушения в функционировании про-апоптотических белков (например – Вах, Bim) и оверэкспрессию анти-апоптотических белков (например – Bcl-2) для повышения устойчивости к апоптозу.

Ген *BCL2L11/BIM* находится в хромосоме 2q13 и кодирует про-апоптотический белок *Bim*, основная функция которого осуществлять взаимодействие с анти-апоптотическими белками суперсемейства *Bcl-2* и последующей их нейтрализации (Willis S.N. et al., 2005; Dai H. et al., 2018). Также *Bim* может напрямую взаимодействовать с белками *Bax* и *Bak*, активируя их, что в итоге приводит к увеличению проницаемости внешней мембраны митохондрий и выходу цитохрома *C* (Sionov R.V. et al., 2015).

Пониженный уровень экспрессии гена *BIM* в опухоли, может быть связан с метилированием его промоторного CpG-островка. Повышенный уровень метилирования гена *BIM* был выявлен при РМЖ, РШМ, ОЛЛ. (Fialkova V. et al., 2017; Huang M. et al., 2017; Braga E.A. et al., 2020). Следует отметить, что гиперметилирование промотора гена *BIM* было связано с более низкой экспрессией *Bim* и меньшей чувствительностью к *Винкрестину*, основному химиотерапевтическому препарату, используемому для лечения острого лимфобластного лейкоза (Huang M. et al., 2017). Также было отмечено, что повышенный уровень метилирования промоторного CpG-островка гена *BIM* статистически значимо коррелирует со стадией опухолевого процесса ($p < 0,001$), размером опухоли ($p < 0,02$), метастазированием ($p < 0,02$) при РМЖ (Филиппова Е.А. и др., 2021).

Экспрессия мРНК гена *BIM* также может регулироваться некоторыми миРНК, к примеру, *miR-148a*, которая, ингибируя экспрессию гена *BIM*, тем самым увеличивает выживаемость клеток глиобластомы (Kim J. et al., 2014) или *miR-92a*, которая усиливает пролиферацию, инвазию и метастазирование опухоли за счет подавления про-апоптотического белка *Bim* при раке толстой кишки (Zaki A. et al., 2022).

Ген *BCL2 (B-cell lymphoma 2)* – кодирует белок *Bcl-2*, который чаще всего функционирует как анти-апоптотический фактор: связывает и инактивирует про-апоптотический белок *Bax*. Кроме того, *Bcl-2* образует комплекс с фактором апоптоза *Araf-1*, предотвращая его способность активировать каспазозависимый путь апоптоза (Hata A.N. et al., 2015).

Уменьшение концентрации белка Bcl-2 приводит клетки к апоптозу. При этом, сверхэкспрессия Bcl-2 предотвращает преждевременную гибель, но не является причиной опухолевой трансформации таких клеток.

Отмечается большое прогностическое значение экспрессии Bcl-2 для НМРЛ (Zhang J. et al., 2015). Так иммуногистохимические методы исследования и прогностический анализ показали, что высокая экспрессия Bcl-2 в тканях рака легкого отрицательно коррелирует с прогнозом больных раком легкого (Chen C. et al., 2021).

При разных видах рака наблюдается как деметилирование промоторного CpG-островка гена *BCL2*, приводящее к его гиперэкспрессии (Мисюрин А.Е. и др., 2014; Губенко М.С. и др., 2022), так и подавление экспрессии гена *BCL2*, посредством связывания мРНК с регуляторными областями этого гена.

В работе (Chen C. et al., 2021), было показано, что Bcl-2 был сильно экспрессирован в клетках рака легких, особенно в клетках клеточной линии H460, по сравнению с нормальной тканью легких человека, при этом чувствительность клеток к цисплатину была значительно снижена. Однако, после подавления экспрессии Bcl-2 *in vitro* с помощью miR-1 в клеточных линиях рака легкого (H460 и A549) чувствительность к цисплатину была значительно повышена.

Стоит отметить, что роль метилирования промоторного района гена *BCL2* в патогенезе НМРЛ не очень понятна. Так в работе (Pargol M., et al., 2021) было показано, что уровень метилирования гена *BCL2* был выше в образцах НМРЛ по сравнению с соседними нормальными тканями. В то же время, было выявлено, что высокие уровни экспрессии белка Bcl2 коррелируют с деметилированием гена *BCL2* в образцах НМРЛ, а метилирование генов *BCL2*, *RARB* и *SIX6* связано с курением. Более того, частота метилирования гена *BCL2* была значительно выше при I стадии НМРЛ, чем при нераковых заболеваниях легких (Zhao Y. et al., 2013).

Эти данные должны стать теоретической основой для уточнения молекулярных механизмов патогенеза и химиорезистентности при раке легкого.

Ген ***BAX/BCL2L4*** (*BCL-2-ассоциированный X-белок*) расположен в районе 19q13.33, состоит из 7 экзонов. Белок Вах в результате своей активации способствует выходу из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль цитохрома С, что приводит к образованию в цитоплазме апоптосомы – комплекса белков из каспазы-9 и цитозольного белка Араf1, что в дальнейшем приводит к активации ряда цистеиновых протеаз – каспаз, которые, в свою очередь, вызывают лизис клеточных белков и опосредуют фрагментацию ДНК (McKenna S. et al., 2021).

При ряде злокачественных новообразований, в том числе и при НМРЛ, была выявлена важность гена *BAX*, как потенциального биомаркера. Так низкая экспрессия Вах была в значительной степени связана с плохим прогнозом у пациентов с аденокарциномой НМРЛ (Jeong S.H. et al., 2008). При этом, в ряде работ было выявлено, что изменение экспрессия белка Вах в злокачественных новообразованиях варьировала в пределах от 35 до 70%, в зависимости от гистологического подтипа опухоли (Плосконос М.В. и др., 2013; Кобяков Д.С. и др., 2014).

Инактивация гена может происходить как в результате точечных мутаций, аллельных и/или гомозиготных делеций, так и гиперметилирования промоторного CpG-островка гена. В работе Manoochehri M. et al., был выявлен пониженный уровень экспрессии мРНК гена *BAX* при раке ЖКТ под действием метилирования (Manoochehri M. et al., 2014). В другой работе было выявлено увеличение уровня метилирования гена *BAX* в опухолевой ткани при раке яичников и показана взаимосвязь высокого уровня метилирования этого гена с отдаленным метастазированием (Филиппова Е.А. и др., 2021). Кроме того, снижения уровня экспрессии этого гена *BAX* под действием метилирования было показано при глиобластоме (Hervouet E. et al., 2010).

Еще одним фактором, влияющим на изменение уровня экспрессии мРНК гена *BAH*, может вступать миРНК. Например, в образцах и клеточных линиях НМРЛ было показано, что ген *BAH* являлся мишенью для miR-3127, miR-379-5p. Инактивация этих миРНК приводила к повышению скорости клеточного апоптоза, значительному снижению миграции и инвазивности опухолей, снижению уровня белков MMP-2, MMP-9 и Bcl-2 и повышению уровня белков Е-кадгерина, Вах и каспазы-3 (Liu YG. et al., 2022; Jiang Y. et al., 2020).

Все это может свидетельствовать о том, что инактивация ген *BAH* влияет на развитие злокачественного новообразования и в дальнейшем может использоваться в качестве маркера для прогноза ответа на лечение и течения болезни.

Как итог, эти три гена участвуют в трехсторонней системе контроля внутреннего апоптоза: Вах непосредственно образует поры в наружной мембране митохондрий, тогда как Bim и анти-апоптотический белок Bcl2 регулируют его активность. В основе этих взаимодействий между представителями Bcl2 семейства лежит способность белков одной функциональной подгруппы связывать белки другой функциональной подгруппы. Таким образом, белки физически нейтрализуют друг друга, образуя гетеродимеры, а их активирующие функции реализуются только взаимодействием прочих активаторов с порообразующим белком Вах, что способствует его димеризации (Сеничкин В.В. и др., 2020).

Ген *APAF1* расположен в области 12q23.1 и кодирует цитоплазматический белок (Araf-1), имеющий 5 изоформ с молекулярной массой 133-142 кДа, содержащий CARD-домен (caspase activation and recruitment domain) на N-конце и 12 повторяющихся аминокислотных WD-40-последовательностей (WD – дипептид из триптофана и аспартата) на С-конце.

Сбои в работе комплекса Araf-1/прокаспазы-9 присутствуют в онкологии различных локализаций, в том числе и при раке легкого (Shakeri R. et al., 2017). Инактивация гена *APAF1* может происходить как в результате

аллельных и/или гомозиготных делеций, эндогенных ингибиторов, так и гиперметилирования промоторного CpG-островка гена, под действием миРНК (Shakeri R. et al., 2021). Так экспрессия мРНК Araf-1 в эмбриональных клетках легкого человека регулировалась метилированием промоторного CpG-островков гена (Chen Y. et al., 2018). Было выявлено, что экспрессия Araf-1 значительно снижена в аденокарциноме легкого и плоскоклеточной карциноме легкого по сравнению с нормальными тканями. Кроме того, сообщалось о снижении экспрессии Araf-1 с помощью miR-484 при НМРЛ (Li T. et al., 2017). Снижение активности Araf-1 коррелирует с благоприятным прогнозом, а также с отсутствием чувствительности к ПХТ и лучевой терапии при разных видах рака, в том числе и при НМРЛ (Shakeri R. et al., 2021).

1.4. Рак лёгкого

Рак – одна из ведущих причин смерти в мире, которая в 2020 г. унесла жизни почти 10 млн человек (Ferlay J. et al., 2020). В 2020 г. наиболее распространенными видами рака (с точки зрения появления новых случаев) были: РМЖ (2,26 млн случаев), РЛ (2,21 млн случаев), РТК (1,93 млн случаев). Стоит отметить, что на первом месте по смертности от онкологического заболевания в 2020 г. был рак легких (1,8 млн. случаев смерти).

В европейских странах рак легкого стоит на втором месте у мужчин (после рака предстательной железы) и на третьем месте у женщин (после РМЖ и РТК) (Ferlay J. et al., 2018). Показатели заболеваемости раком легкого выше в более развитых странах, чем в менее развитых странах. Чаще всего рака легкого выявляется у пациентов в возрасте старше 60 лет.

В российской популяции онкобольных в 2020 г. рак легкого диагностирован у 54375 человек, в то же время у 39371 человек диагностирован неблагоприятный исход. От рака легкого ежегодно умирает больше больных, чем от рака простаты, молочной железы и толстой кишки вместе взятых (А.Д. Каприн и др., 2021). Показано, что при обнаружении рака легкого на первой – второй стадии выживаемость пациентов составляет 57–67%, на третьей – 5–25% и на четвертой – менее 1% (Каприн А.Д., и др. 2021).

Так каковы же причины возникновения НМРЛ?

Главными причинами возникновения рака легкого к 2023 году, считается курение табака и курительных смесей, а также использование электронных сигарет (вейпов). В Европе на них приходится 85% всех случаев рака (Planchard D. et al., 2018). Количество лет, в течение которых человек курил, важнее, чем количество выкуриваемых сигарет в день. Прочие – пассивное курение, газ радон, вредные условия труда (работа с асбестом, пластиком, краской и т.д.), генетическая предрасположенность (Bailey-Wilson J.E. et al., 2004). Неблагоприятный семейный анамнез также увеличивает риск развития рака легкого.

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет примерно 85% всех случаев рака легкого. НМРЛ гистологически подразделяется на три основных подтипа: плоскоклеточный рак (ПРЛ) (25-30%), аденокарциному (АД) (40%) и крупноклеточную (недифференцированную) карциному (10-15%) (Sung S. et al., 2020). Стадирование рака легкого, как и всех онкологических заболеваний, происходит по системе TNM, исходя из которой выставляется диагноз. Различные стадии НМРЛ описаны в таблице ниже (табл.1) (Planchard D. et al., 2018).

Для снижения смертности от онкологических заболеваний, в том числе и рака легкого, необходима профилактика и выявление ранних форм заболевания. Программа диспансеризации взрослого населения разработана Минздравом Российской Федерации и уже запущена в 2017 году. Поэтому многочисленные исследования сосредоточены на выявлении специфических и клинически применимых молекулярных биомаркеров для раннего выявления рака легкого.

Молекулярно-генетические характеристики НМРЛ

Помимо хирургического и лучевого лечения, пациенты со злокачественными образованиями в легких получают адъювантную и неадъювантную лекарственную терапию.

При планировании терапии учитывается стадия заболевания, прогноз, влияние лечения на качество жизни, возможные осложнения, а также гистологический вариант опухоли и молекулярно-генетические

характеристики. При выявлении активирующих мутаций в гене EGFR и транслокаций в ALK, ROS1, назначают таргетную терапию. При отсутствии драйверных молекулярно-генетических мутаций проверяется экспрессия опухолевыми клетками PD-L. В случае положительного результата, назначается иммунотерапия – пембролизумаб, ниволумаб и т.д.

Таблица 1. Стадирование рака легкого

Ранние стадии	IA	1	0	0	Опухоль не более 3 см
	IB	2a	0	0	Опухоль размером 3-4 см
	IIA	2b	0	0	Опухоль размером 4-5 см
	IIB	1/2	1	0	Опухоль не более 5 см, распространилась только на близлежащие лимфатические узлы
		3	0	0	Опухоль размером 5-7 см или в одной доле более одной опухоли
Местно-распространенный рак	IIIA	1/2	2	0	Опухоль не более 5 см, распространилась только на лимфатические узлы.
		3	1	0	Опухоль размером 5-7 см или в одной доле более одной опухоли; она распространилась на близлежащие лимфатические узлы и может проникать в другие части легкого, дыхательные пути.
	IIIB	3/4	2	0	Опухоль размером 5-7 см или более или в одной доле более одной опухоли; распространилась на другие лимфатические узлы и может проникать в другие части легкого, дыхательные пути или окружающие области непосредственно за пределами легкого, например, в диафрагму.
Метастатический рак	IV	любая	любая	1	Опухоль имеет любой размер и может распространяться или не распространяться на лимфатические узлы. Рак находится в обоих легких, распространился на другую часть тела (например, печень, надпочечники, мозг или кости) или вызвал скопление содержащей раковые клетки жидкости вокруг легких или сердца.

Примечание: T – размер первичной опухоли, N – наличие или отсутствие метастазов в лимфатических узлах, M – метастазы в другие органы.

На сегодняшний день существуют много мишеней, на которые можно воздействовать при лечении НМРЛ, и по совместительству данные мишени могут стать биомаркерами рака.

А.В. Снеговой биомаркеры делит на две группы:

- 1) диагностические (прогностические) – предсказывают прогноз заболевания, течение болезни
- 2) предиктивные – предсказывают эффект от проводимого лечения, влияние препаратов на пациента (Снеговой А.В., Манзюк Л.В. 2011).

При НМРЛ помимо структурных изменений в ДНК генов, происходят и обратимые изменения в экспрессии генов, не связанные с изменением первичной последовательности ДНК. Влияние на экспрессию гена могут оказывать три процесса – метилирование ДНК, модификация гистонов и аномальная экспрессию некодирующих РНК, включая миРНК.

Профилирование экспрессии миРНК уже используется в клинической онкологии для того, чтобы прогнозировать течение заболевания и ответ на ПХТ (Reddy K.V. 2015). Так в работе (Zhang L., Yu S. 2018) было показано изменение уровня экспрессии miRNA-520b в опухоли. Наблюдалось снижение уровня экспрессии miR-520b в низкодифференцированных опухолях.

В ряде работ отмечено, что для рака легкого так же характерно метилирование промоторов значительного числа как белоккодирующих генов, таких как *RASSF1A*, *APC*, *CDH1*, *DAPK*, *MGMT*, *FHIT*, *PTEN* и др., так и генов миРНК (*MIR9-3*, *MIR34B* и др.). Они участвуют в апоптозе, клеточной регуляции, пролиферации и т.д. (Шикеева А.А. и др., 2013)

Стоит отметить, что некоторые факторы, такие как курение, воспалительные заболевания и плохая экология, приводят к гиперметилированию ДНК при НМРЛ (Georgiadis P. et al., 2016). Метилированная опухолевая ДНК может служить как перспективный биомаркер для НМРЛ, который, в дальнейшем, может быть использован для выявления заболевания, ответа на ПХТ и определения выживаемости после постановки диагноза.

1.5. Заключение

Значимым событием в диагностике и лечении НМРЛ стало открытие молекулярных маркеров, не затрагивающих структуру ДНК, которые могут иметь диагностическое и прогностическое значение. Анализ этих новых маркеров при обследовании пациента возможно позволит назначить оптимизированное лечение больному, исключит выбор заведомо неэффективной терапии. Большие надежды на данный момент связывают с оценкой эпигенетического профиля опухоли, заключающейся в определении метилирования белоккодирующих генов и генов миРНК, а также изменения профиля их экспрессии.

С точки зрения практикующего врача, главным вопросом является как применить эти эпигенетические маркеры для описания патоморфологических процессов, протекающих в опухоли, например – увеличение размера опухоли, снижение степени дифференцировки клеток, метастазирование в регионарные лимфоузлы и др. Поэтому, перед исследователями стоит задача – определить те эпигенетические маркеры, которые в последующем могут помочь врачу-онкологу подобрать оптимальную для каждого пациента схему лечения (Шикеева А.А. и др., 2013).

Основным направлением в последние годы стала оценка изменения уровня экспрессии различных миРНК, что позволило объяснить, как гетерогенность строения опухоли, так и процессы, приводящие к возникновению того или иного вида рака, в том числе НМРЛ. МиРНК – это новый класс биомаркеров, перспективных для диагностики и прогноза исхода заболевания, а также ответа на лечение (Родионов Е.О. и др., 2020).

В этой работе мы сосредоточились на исследовании влияния эпигенетических факторов: метилирования ДНК и изменении экспрессии миРНК на экспрессию опухоль-ассоциированных белоккодирующих генов, участвующих в процессе программируемой клеточной гибели.

Следует, однако, отметить, что полученные нами результаты о диагностическом потенциале миРНК и их влиянии на экспрессию исследованных генов требуют, как дополнительных независимых исследований, так доклинической/клинической проверки.

Анализ как российской, так и зарубежной литературы показывает, что существующие в настоящее время принципы классификации и прогноза опухолевого процесса, хотя и имеют реальное применение, не всегда эффективны, и нужны дополнительные более расширенные исследования, которые позволят разработать новые методы диагностики и подходы к терапии опухолей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая характеристика образцов НМРЛ

В исследование были отобраны парные образцы опухолевой и здоровой ткани операционного материала от 70 пациентов с диагнозом НМРЛ, 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 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 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» на основании соглашения от 20.01.2020 № 20/1 о взаимном сотрудничестве с ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все случаи НМРЛ классифицированы клинически по системе TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 2002 г.) и описаны гистологически на основании классификации Всемирной Организации Здравоохранения в отделе патоморфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Табл. 2).

Взятые образцы тканей помещались в жидкий азот и далее хранились при -70°C .

Критерии включения и исключения при формировании групп

Критерии включения больных:

- возраст больных от 18 до 80 лет;
- наличие гистологически подтвержденного диагноза НМРЛ

Критерием исключения:

- являлось проведение неоадьювантного лечения
- отказ от лечения
- хронические заболевания

Таблица 2. Клинико-патологические параметры больных НМРЛ

Клинико-патологический параметр		N=70	%
Гистологический тип	Плоскоклеточный рак легкого (ПРЛ)	39	55,7
	Аденокарцинома легкого (АД)	31	44,3
Стадия опухоли	I	14	20,0
	II	28	40,0
	III	20	28,6
	IV	8	11,4
Степень дифференцировки	G1	6	8,6
	G2	35	50,0
	G3	29	41,4
Размер опухоли	T1	11	15,7
	T2	35	50,0
	T3	13	18,6
	T4	11	15,7
Лимфогенное метастазирование	N0	29	41,4
	N1	41	58,6
Отдаленное метастазирование	M0	62	88,6
	M1	8	11,4
Табачная зависимость	курит	50	71,4
	не курит	20	28,6

2.2. Выделение ДНК и РНК из биологического материала

2.2.1. Выделение геномной ДНК из ткани

Выделение ДНК из замороженных образцов проводили по стандартной методике методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook J., 1989). Выделенную ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера (10 ммоль Трис-НСl рН=8,0, 0,1 ммоль ЭДТА рН=8,0) и хранили при -20⁰С. Далее выделенную ДНК использовали для бисульфитной конверсии с последующим количественным метилспецифичным ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Качество и примерную концентрацию ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле (Рис. 6). На рисунке хорошо видно, что фрагменты ДНК, в основном, имеют массу более 45 т.п.н.

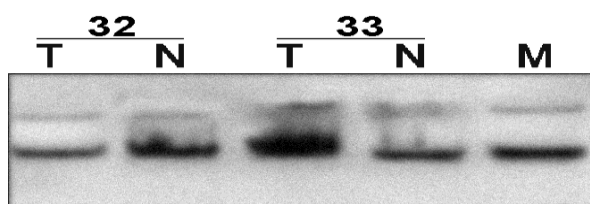


Рисунок 6. Картина электрофоретического разделения препаратов ДНК образцов НМРЛ в 1.0 % агарозном геле. Т – ДНК из опухолевой ткани; N – ДНК из гистологически нормальной ткани; М – ДНК фага λ (45 т.п.н.).

«Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация составила от 170 до 500 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9$. Целостность ДНК оценивали при помощи 0.8% агарозном геля. В качестве стандарта использовали ДНК фага лямбда с известной концентрацией. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и сканировали в УФ-свете с помощью системы гель-документации GelDocEZ Imager (фирмы BioRad)» (Филиппова Е.А. М., 2020).

2.2.2 Выделение суммарной (тотальной) РНК

Суммарную РНК выделяли из ткани опухоли и парной гистологически нормальной ткани с помощью модифицированного метода гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформенной экстракции (Sambrook J., 1989; Пронина, И.В. 2010).

«Замороженный образец объемом 0.200 см^3 измельчали в жидком азоте, переносили в пробирки «Eppendorf» на 2.0 мл с добавлением 500 мкл денатурирующего буфера (2.7М гуанидинатиоцианат, 1.3М аммония тиоцианат, 100мМ натрия ацетат pH 4.0, 5мМ ЭДТА), тщательно перемешивали. На холоде добавляли 1мл кислого фенола (фенол 60%, глицерин 8%, 100 мМ натрия ацетат pH 4,0), еще раз перемешивали. Потом,

также добавляли 500 мкл хлороформа, получившуюся смесь тщательно перемешивали и инкубировали 10 минут в твердотельном термостате («Термит», ДНК-технология, Россия). Для разделения фаз пробирки центрифугировали 15 мин при температуре 4⁰С и 12000 об/мин. Верхнюю фазу переносили в чистые пробирки. Добавляли 1.5-кратный объем изопропанола и центрифугировали в течение 30 мин при температуре 4⁰С и 12000 об/мин, затем дважды промывали 2-кратным объемом 80% этанола. Полученный осадок растворяли в 500 мкл денатурирующего буфера и далее повторяли вышеизложенный протокол. Полученный после второго переосаждения осадок РНК растворяли в деионизованной воде и хранили при температуре - 70⁰С в низкотемпературном холодильнике» (Пронина И.В., 2010).

«Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация РНК составила от 0,7-1,1 мг/мл, A260/A280 = 1,97-2,05. Целостность ДНК оценивали при помощи денатурирующего электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем формальдегид 10%, 0,5xбуфер MOPS (MOPS 10мМ, ацетат натрия 2,25мМ, ЭДТА 0,5мМ, рН 7,0). К образцу РНК объемом 3 мкл добавляли 9 мкл денатурирующего буфера (45% формальдегида, 45% формамида, 70 мкг/мл бромистого этидия, 0,5x буфер MOPS). Пробы инкубировали 15 мин. при 70⁰С и наносили на гель. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и сканировали в УФ-свете с помощью системы гель-документации GelDocEZ Imager (фирмы BioRad). Качество РНК оценивали по соотношению плотности полосок, соответствующих большой и малой рибосомным субъединицам (Рис. 7).» (Филиппова Е.А. М., 2020).

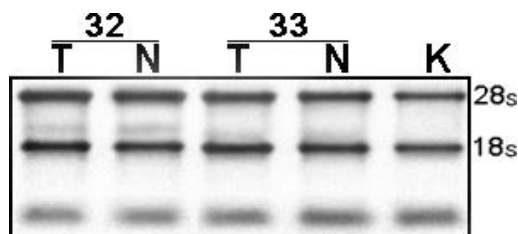


Рисунок 7. Пример электрофоретическое разделение тотальной РНК в денатурирующем агарозном геле: 32 и 33 – номера образцов НМРЛ, Т – ткань

опухоли, N – парная гистологически нормальная ткань, K – контрольный образец.

«Отношение интенсивностей должно быть приблизительно равно 2 (варьирует от 1,7 до 2,3 в зависимости от сохранности ткани, из которой выделялась РНК). При распаде РНК отношение интенсивностей полос 28S и 18S рРНК снижается до 1 и менее. В некоторых случаях полоса 28S рРНК исчезает вовсе. Образцы, у которых отношение 28S/18S значительно отличается от 2, для дальнейших исследований не используются» (Пронина И.В., 2010).

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

2.3.1. Реакция обратной транскрипции

Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit в соответствии с протоколом производителя - («ЗАО Евроген», Россия).

Перед проведением реакции 11 мкл раствора суммарной РНК прогревали 5 мин при 72⁰С для расплавления вторичных структур РНК и затем охлаждали образцы во льду. Реакционную смесь готовили, смешивая 4 мкл 5хбуфера для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси dNTP (10 мМ каждого), 2 мкл 20 мМ DTT, 1 мкл вырожденных праймеров NNNNNN (20 мкМ).

Синтез первой цепи кДНК проводили по программе, в соответствии с протоколом производителя набора («ЗАО Евроген», Россия) в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия): 1-й цикл – 37⁰С/60 минут. 2-й цикл – 72⁰С/10 минут. Полученную кДНК хранили при -20⁰С. Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для дальнейших исследований уровня экспрессии белок-кодирующих генов.

2.3.2. SYBR Green ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии генов *APAF1*, *BCL2*, *DAPK1*, *VIM/BCL2L11*, *BAX/BCL2L4* проводили ПЦР-РВ по технологии SYBR Green с использованием набора qPCRMix-HS SYBR (5x) в соответствии с протоколом

производителя («ЗАО Евроген», Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad, США). Праймеры для генов *APAF1*, *DAPK1*, *BCL2*, *BAX* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем, относительно которого и проводили нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, взяты из работ (Pronina I.V. et al. 2017; Kontos C.K. et al., 2013). Последовательности праймеров для гена *VIM* подобраны с использованием пакета программ DNASTAR Laser Gene и приведены в (табл. 3).

Таблица 3. Используемые олигонуклеотиды для ПЦР-РВ

Локус	Структура праймеров (5'-3')	$T_{отж}$, °C	Размер продукта п.н.
<i>VIM</i>	F: TGCCAGGCCTTCAACCACTATCTCA R: GGGTGGTCTTCGGCTGCTTGGTAAT	60	176

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер.

«Для каждой пары праймеров были подобраны оптимальные режимы амплификации. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл 1xqPCRmix-HS SYBR («ЗАО Евроген», Россия), по 0.4 мкМ каждого праймера, 50-100 нг кДНК матрицы; в 96-луночных планшетах «Optical Reaction Plate» по следующей программе:

- предварительная денатурация: 1 цикл, 95°C, 5 мин;
- ПЦР: 40 циклов {95°C – 30с; $T_{отж}$ – 30с; 72°C – 30с}.

Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК» (Филиппова Е.А. М., 2020).

Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по $\Delta\Delta Ct$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее чем в 2 раза ($|\Delta\Delta Ct| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений (Pronina I.V. et al., 2016). В качестве примера, показаны данные, полученные с помощью ПЦР-РВ, иллюстрирующие вид кинетических кривых и кривых плавления, полученных при определении уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1* (рис. 8).

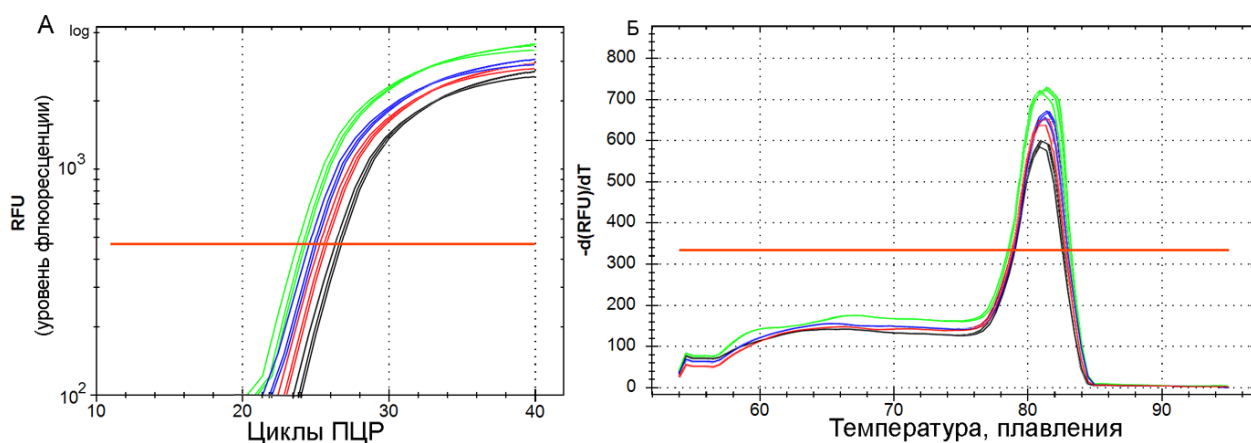


Рисунок 8. Пример амплификации фрагмента кДНК гена *DAPK1* методом ПЦР в «реальном времени» в 2-х парных образцах НМРЛ; А – кинетические кривые амплификации; Б – температурные кривые плавления продукта амплификации.

2.4. Оценка экспрессии генов микроРНК методом TaqMan ПЦР-РВ

2.4.1. Реакция обратной транскрипции

Для определения уровня экспрессии миРНК miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-137, miR-339-3p, miR-375 использовали тотальную клеточную РНК, выделенную по стандартному протоколу (см. гл. 2.2.2.). «В качестве внутреннего контроля использовали малую РНК U6B (RNU6B), которая стабильно экспрессируется как в норме, так и в патологии. После выделения тотальной РНК осуществляли реакцию обратной транскрипции с применением комплекта TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США) совместно со специфичными 5х праймерами (Thermo Fisher Scientific, США) к каждой исследуемой миРНК по протоколу производителя с целью получения комплементарной ДНК (кДНК). Обратную транскрипцию проводили в 96-луночных планшетах «Optical Reaction Plate» с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в 10 мкл. Полученные образцы кДНК хранили при температуре не более -20°C . Синтезированную кДНК использовали в качестве матрицы для дальнейших исследований уровня экспрессии генов миРНК» (Филиппова Е.А. М., 2020).

2.4.2. ПЦР с детекцией в реальном времени

«Синтезированную в результате обратной транскрипции кДНК использовали для постановки количественной ПЦР с детекцией в реальном времени, применяя комплекты реагентов, содержащих зонды и специфичные праймеры к миРНК по протоколам коммерческого набора TaqMan®MicroRNA Assays Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Амплификацию и детекцию осуществляли методом ПЦР в реальном времени на приборе BioRad CFX96 qPCRSytem (Bio-Rad, США) в 96-луночных планшетах в объеме по 20 мкл в каждой лунке, содержащем ПЦР буфер: 7.67 мкл без РНК-азная вода, 1 мкл TaqMan Small RNA Assay (20X), 10 мкл TaqMan Master Mix, 1.33 мкл праймера исследуемой миРНК, входящей в набор TaqMan™ MicroRNA Assay (Каталожный номер: 4427975 (Thermo Fisher Scientific, США): miR-124-3p (ID: 001182), miR-125b-5p (ID: 000449), miR-127-5p (ID: 002229), miR-129-5p (ID: 000590), miR-137 (ID: 001129), miR-339-3p (ID: 002184), miR-375 (ID: 000564), RNU6B (ID: 001093) в соответствующие лунки. Условия ПЦР следующие: 95⁰С - 10 мин. и 40 циклов: 95⁰С - 15 сек., 60⁰С – 1 мин» (Филиппова Е.А. М., 2020).

Результаты ПЦР в реальном времени были проанализированы по методу определения величины C_t (Pronina I.V. et al., 2016). Относительный уровень экспрессии миРНК для исследуемых образцов рассчитывали по формуле:

«Изменение экспрессии исследуемого гена = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{miR}} - C_{t_{U6}})$ опытный обр. – $(C_{t_{miR}} - C_{t_{U6}})$ контр. обр.; C_t (threshold cycle) – пороговый цикл, цикл на котором пороговый уровень флуоресценции превышает базовый уровень (threshold над baseline) в диапазоне 5-8 стандартных отклонений» (Филиппова Е.А. М., 2020).

Каждый эксперимент выполнялся не менее чем в трех повторах с дальнейшим расчетом среднего значения.

2.5. Бисульфитная конверсия ДНК

Для определения уровня метилирования 5 белоккодирующих генов (*APOA1*, *BCL2*, *DAPK1*, *VIM/BCL2L11*, *BAX/BCL2L4*) и 10 генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *MIR1258*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR339*, *MIR375*) использовали бисульфитную конверсию ДНК с последующей ПЦР-РВ по технологии SYBR Green на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad, США).

«Метод основан на способности молекулы гидросульфита натрия (NaHSO_3) взаимодействовать с цитозином в составе одноцепочечной ДНК с превращением последнего в урацил; 5-метилцитозин при тех же условиях модификации не подвергается. В дальнейшем проводилась амплификация исследуемой последовательности ДНК с помощью ПЦР. При этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин и только 5'-метилцитозин воспроизводится как цитозин. Бисульфитная конверсия проводилась с использованием 0,5–1,5 мкг ДНК, как описано ранее (Логинов В.И. и др., 2004). ДНК после обработки бисульфитом очищали, используя колонки MilliporeSigma™ Microcon-30 kDa Centrifugal Filter Unit, Ultracel YM-30 («Merck Life Science», Германия). Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при +4°C и использовали в качестве матрицы при проведении метилспецифичной ПЦР-РВ (МС-ПЦР-РВ)» (Филиппова Е.А. М., 2020).

2.6. Метил-специфичная ПЦР-РВ (МС-ПЦР-РВ)

Для анализа уровня метилирования генов *APOA1*, *BCL2*, *DAPK1*, *VIM/BCL2L11*, *BAX/BCL2L4*, *MIR124-1/2/3*, *MIR1258*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR339*, *MIR375* методом МС-ПЦР-РВ были использованы праймеры ранее описанные в литературе (Логинов В.И. и др., 2016; Брага Э.А. и др., 2019; Логинов В.И. и др., 2021). Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК.

«МС-ПЦР-РВ проводили на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (Bio-Rad, США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR фирмы Евроген

(Россия). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1x qPCRmix-HS SYBR, по 0,4 мкМ каждого праймера, 50-100 нг ДНК матрицы; в 96-луночных планшетах «Optical Reaction Plate» на амплификаторе BioRad CFX96 qPCR System (BioRad, США) по следующей программе:

- предварительная денатурация: 1 цикл, 95⁰С, 5 мин;
- ПЦР: 40 циклов {95⁰С – 30с; T_{отж},⁰С – 30с; 72⁰С – 30с}.

ПЦР для каждого образца повторяли трижды. Обработку полученных данных проводили в программной среде Precision Melt Analysis Software (BioRad)» (Филиппова Е.А. М., 2020).

В качестве примера показаны данные, полученные с помощью МС-ПЦР-РВ, имеющие вид кинетических кривых и кривых плавления, полученных для гена *VIM/BCL2L11* (рис. 9).

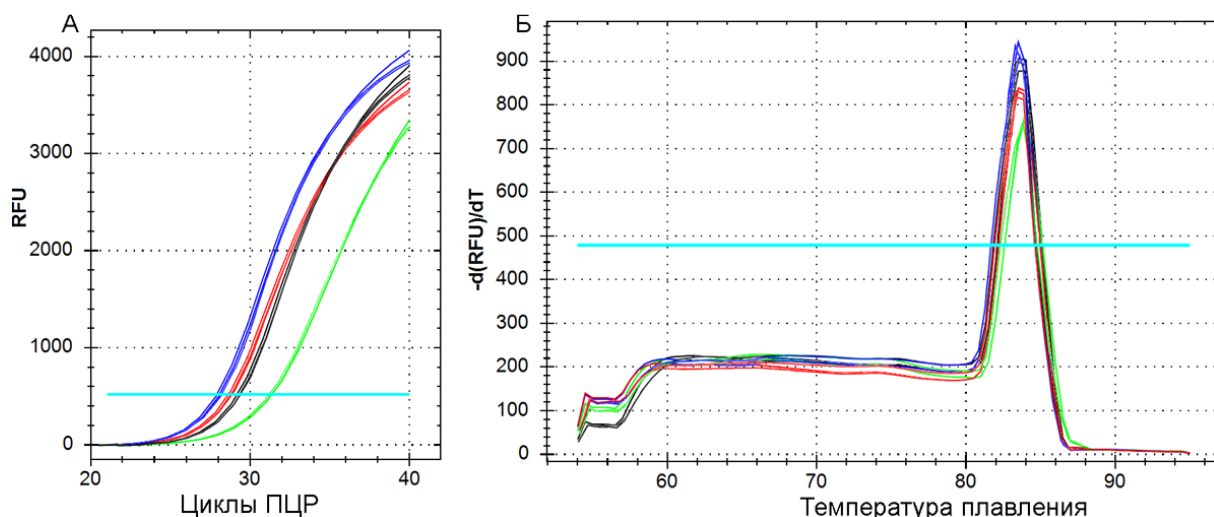


Рисунок 9. Пример амплификации модифицированной ДНК гена *VIM/BCL2L11* методом МС-ПЦР-РВ в образцах 32Т, 32N, 33Т и контроля метилированного аллеля. А – кинетические кривые амплификации; Б – температурные кривые плавления продукта амплификации.

В качестве контроля контаминации ДНК использовали пробы без добавления модифицированной ДНК. В качестве позитивных контролей для неметилованных аллелей и метилированных аллелей использовали

коммерческие препараты ДНК #G1471 (Promega, США) и #SD1131 (Thermo Fisher Scientific, США), соответственно.

«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 100% и может быть интерпретирован как процент метилирования, при этом ИМ = 0 представляет полное отсутствие метилирования и ИМ = 100 % означает полное метилирование гена» (Филиппова Е.А. М., 2020).

2.7. Программное обеспечение

1) Биоинформатический поиск опухоль-ассоциированных генов, участвующих в путях запрограммированной клеточной гибели, с изменённым уровнем экспрессии при НМРЛ и его гистологических подтипов (ПКР и АД проводили на основе анализа данных представленных на интернет-ресурсе «GEPIA2.0» («Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2.0», <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>).

2) Поиск возможно взаимодействующих пар миРНК – мРНК ген-мишень проводили на основе анализа данных интернет-ресурса miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>).

2.8. Статистическая обработка результатов

Автором самостоятельно проведена статистическая обработка полученных данных. Для статистической обработки результатов проведенного исследования все данные о 70 больных НМРЛ после формализации были внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL 2019 г. Статистический анализ проводили в пакетах программы Microsoft Excel 2019, IBM SPSS Statistics 22.0.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли в виде Me (Q1-Q3), где Me – медиана, Q1 – нижний квартиль, Q3 – верхний квартиль.

В случае распределений, не соответствующих нормальному закону, 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 белоккодирующих генов оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

Для определения диагностического потенциала метилирования генов миРНК при НМРЛ и создания на их основе диагностических панелей, использовали ROC-анализ с построением ROC-кривых.

Различие групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$. Достоверность значений p проверяли с помощью поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение; результат считали значимым при FDR (false discovery rate) ≤ 0.25 .

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование роли эпигенетической регуляции уровня экспрессии мРНК опухоль-ассоциированных белоккодирующих генов, важно для выявления роли этих генов в развитии злокачественных опухолей легкого. Выявление метилирования в промоторных районах белоккодирующих генов и генов миРНК, а также их измененную экспрессию в опухоли можно использовать для определения сигнальных каскадов, характерных для НМРЛ и его гистологических подтипов. Данные по метилированию можно использовать для отбора новых диагностических маркеров для диагностики онкологических заболеваний. Найденные статистически значимые ассоциации между уровнем метилирования гена и клинико-патологическими характеристиками образцов опухоли могут быть использованы для выявления новых маркеров прогноза, пятилетней выживаемости, мониторинга течения заболевания и эффективности лечения.

На основании анализа данных литературы и интернет - ресурсов нами был проведен отбор генов миРНК и белоккодирующих генов, возможно ассоциированных с возникновением и развитием НМРЛ, отвечающих следующим критериям:

1) Наличие данных о возможности взаимодействия отобранных миРНК с 3'-регионом мРНК белоккодирующих генов, с формированием пар миРНК-мРНК ген-мишень (miRWalk, <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/>).

2) наличие CpG-островка в области не далее 2000 п.н. от 5' конца гена миРНК или старта транскрипции для белоккодирующего гена;

3) наличие данных о изменении уровня метилирования гена миРНК или белоккодирующего гена в эпителиальных опухолях любых локализаций.

В итоге выбраны и исследованы следующие 10 генов миРНК: *MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR1258*, *MIR339*; и 5 белоккодирующих генов: *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2*, *BAX/BCL2L4*, *VIM/BCL2L11*.

Экспериментальная часть включает исследование выборки из 70 парных образцов (опухоль / гистологически нормальная ткань) от пациентов с НМРЛ.

Анализ уровня метилирования 10 генов миРНК при НМРЛ выполнен на 70 парных образцах. Анализ уровня метилирования и экспрессии 5 белоккодирующих генов при НМРЛ выполнен на 35 парных образцах.

Анализ уровня экспрессии миРНК miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-137, miR-339-3p, miR-375 при НМРЛ выполнен на 35 парных образцах опухолей и гистологически нормальной ткани пациентов.

В работе были использованы следующие основные методы исследования:

- метод количественной МС-ПЦР-РВ для анализа уровня метилирования генов миРНК и белоккодирующих генов;
- метод количественной ПЦР-РВ с использованием TaqMan зондов для оценки экспрессии миРНК и SYBR Green красителя для оценки экспрессии белок-кодирующих генов.

3.1. Ассоциация aberrантного метилирования белоккодирующих генов и генов миРНК с развитием и прогрессией НМРЛ

Методом количественной МС-ПЦР-РВ исследованы уровни метилирования промоторных CpG-островков 5-ти апоптоз-ассоциированных БКГ: *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *VIM* и *DAPK1*. Исследование выполнено на выборке из 35 парных образцов ДНК НМРЛ. По результатам рассчитан индекс метилирования для каждого парного образца и гена (Рис. 10).

Используя критерий Манна-Уитни для независимых выборок, было показано статистически значимое увеличение уровней метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *VIM* и *DAPK1* в опухолевой ткани НМРЛ. Напротив, статистически значимое деметилирование отмечено у анти-апоптозного гена *BCL2* (рис. 11).

Полученные данные позволяют предполагать вовлеченность этих генов в патогенез НМРЛ.

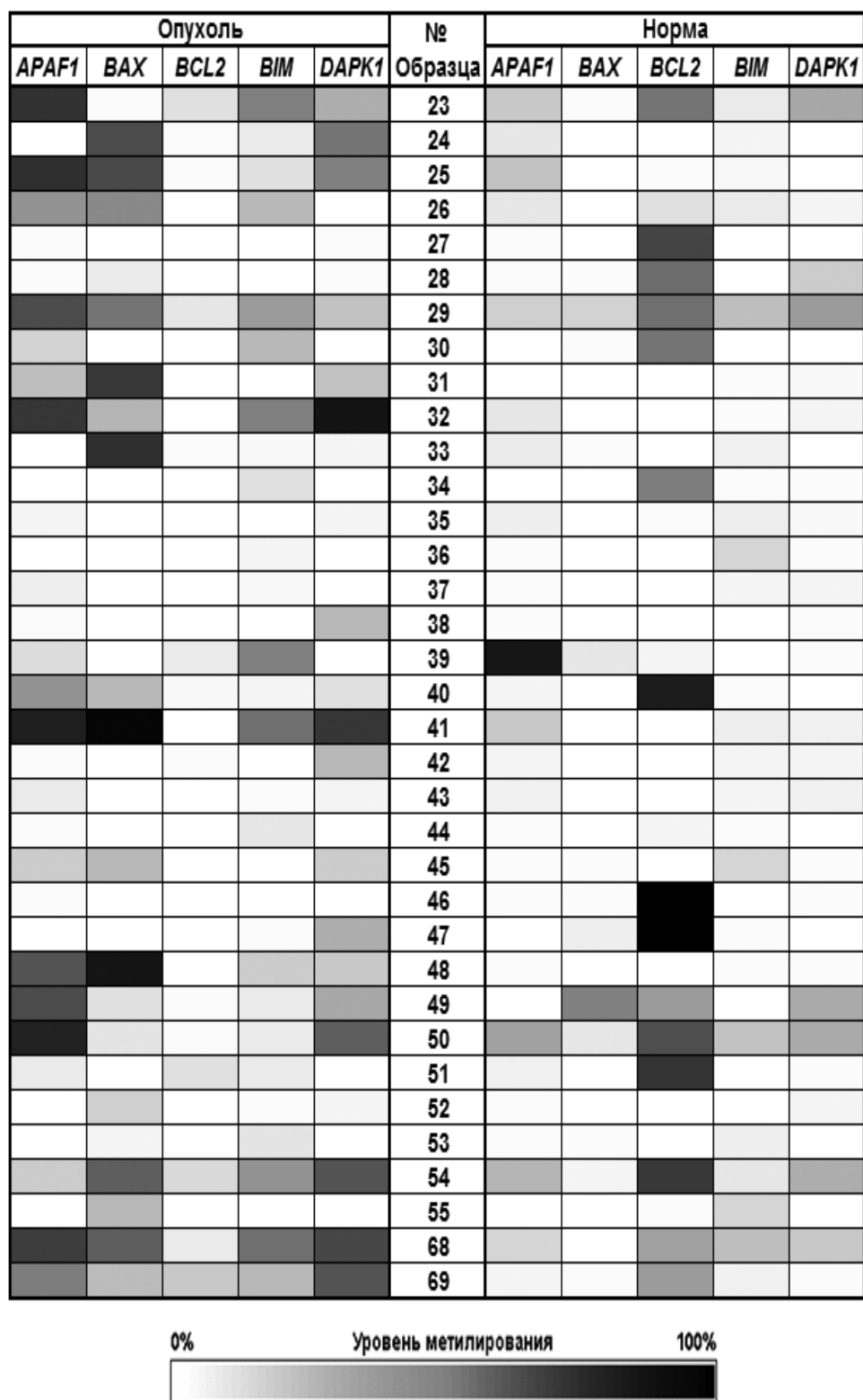


Рисунок 10. Уровень метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *BIM*, *BCL2* и *DAPK1* при НМРЛ. Результаты приведены в виде градиента от 0% (отсутствие метилирования) до 100% (метилирование всех копий гена)

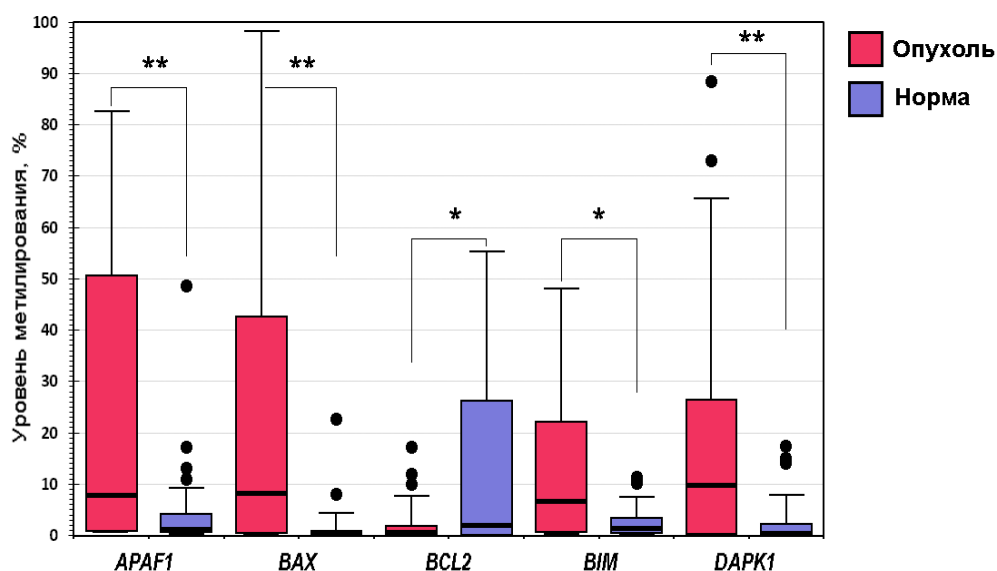


Рисунок 11. Профили метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* в образцах НМРЛ. Рассчитано с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Здесь и далее, как в статье (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022. С. 5-12): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; верхняя и нижняя граница прямоугольников соответствуют $Q1$ и $Q3$. Линия внутри прямоугольника соответствует Me . Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечена "ограда", расположенная на 1.5 межквартильных расстояний ($Q1-Q3$) от нижней и верхней границ коробки. Все точки за пределами «ограды» помечались как «вылетающие» наблюдения, или «выбросы».

Далее, был проведен анализ изменения уровня метилирования исследованных генов в зависимости от клиничко-морфологических параметров НМРЛ (клиническая стадия опухолевого процесса, степень дифференцировки, размер опухоли, наличие или отсутствие лимфогенного метастазирования, статус курильщика). Было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* и *DAPK1*, на более тяжелых III–IV стадиях НМРЛ по сравнению с более ранними стадиями (I–II) (рисунок 12А). Также статистически значимо высокий уровень метилирования генов *APAF1*, *BIM*, *DAPK1* был связан с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4) (рисунок 12Б), а для генов *APAF1*, *BAX*, *DAPK1* – с наличием лимфогенного метастазирования (N0 против N1) (рисунок 12В).

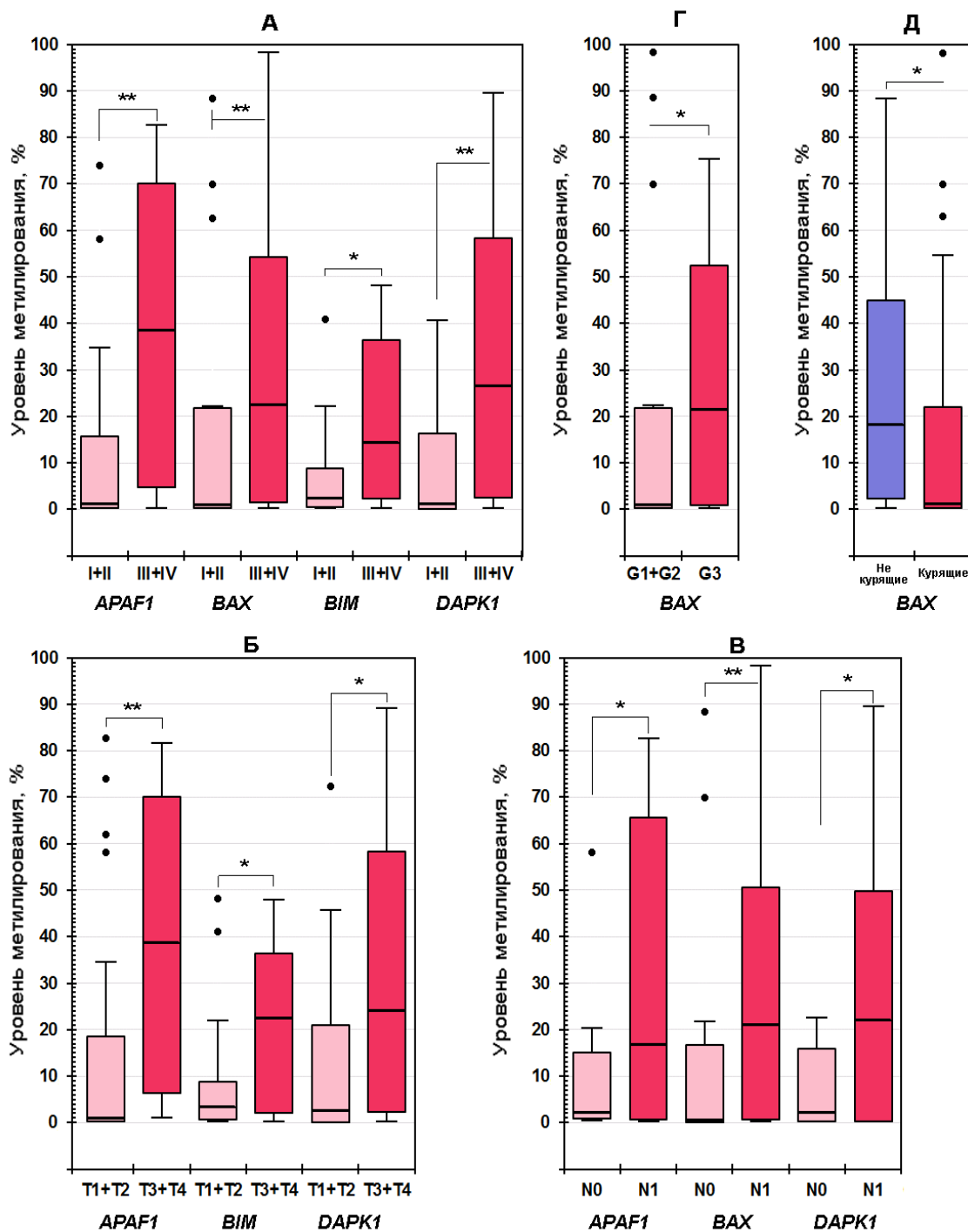


Рисунок 12. Связь уровня метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* и *DAPK1* с клинической стадией (А); размером опухоли (Б); лимфогенным метастазированием (В); степенью дифференцировки (Г) и статусом курильщика (Д) при НМРЛ. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

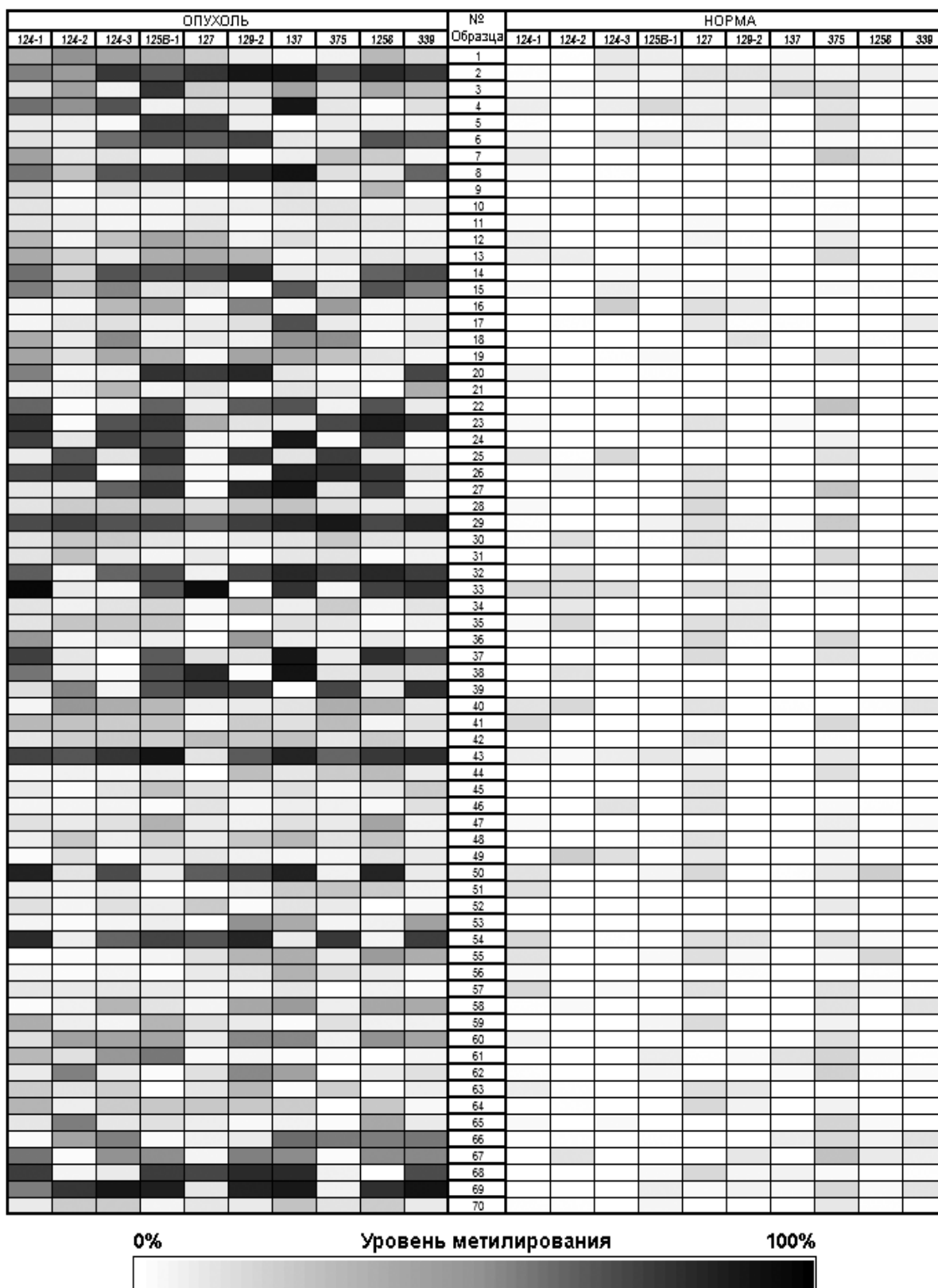


Рисунок 13. Уровень метилирования 10-ти генов миРНК при НМРЛ. Результаты приведены в виде градиента от 0% (отсутствие метилирования) до 100% (метилирование всех копий гена).

Стоит отметить, что для гена *BAX* было показано значимое увеличение уровня метилирования промоторного CpG-островка в низкодифференцированных (G3) образцах опухоли НМРЛ по сравнению с высоко- и среднедифференцированными образцами (G1/G2) (рисунок 12Г).

При оценке уровня метилирования промоторных областей генов *APAF1*, *BAX*, *BIM* и *DAPK1* в группах больных в зависимости от статуса курильщика, был показан статистически значимо высокий уровень метилирования гена *BAX* у некурящих пациентов (рисунок 12Д).

Таким образом, полученные результаты указывают на связь метилирования онко-супрессорных генов *DAPK1*, *BIM*, *BAX* и *APAF1* с патофизиологическими признаками прогрессии НМРЛ.

Далее нами был проведен анализ статуса метилирования 10-ти генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR1258*, *MIR339*) на выборке из 70 парных (опухоль/парная гистологически неизменная прилежащая к опухоли ткань) образцов НМРЛ (рисунок 13), включая 39 случаев с плоскоклеточным раком и 31 с аденокарциномой легкого.

Совокупный уровень метилирования всех образцов был статистически значимо выше в опухоли, чем в гистологически неизменной ткани легкого у 8-и генов миРНК: *MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR1258*, *MIR339* ($p < 0.01$, $FDR \leq 0.25$) (рис. 14). Следует сказать, что высокий уровень метилирования гена миРНК *MIR339* в опухолевых образцах НМРЛ показано впервые. Эти данные позволяют предположить связь метилирования этих 8 генов миРНК с возникновением НМРЛ.

Далее полученные результаты об изменении уровня метилирования для этих 10-ти генов миРНК были сопоставлены для гистологических подтипов НМРЛ – плоскоклеточного рака (ПРЛ) и аденокарциномы (АД) легкого (Приложение. Табл. 1).

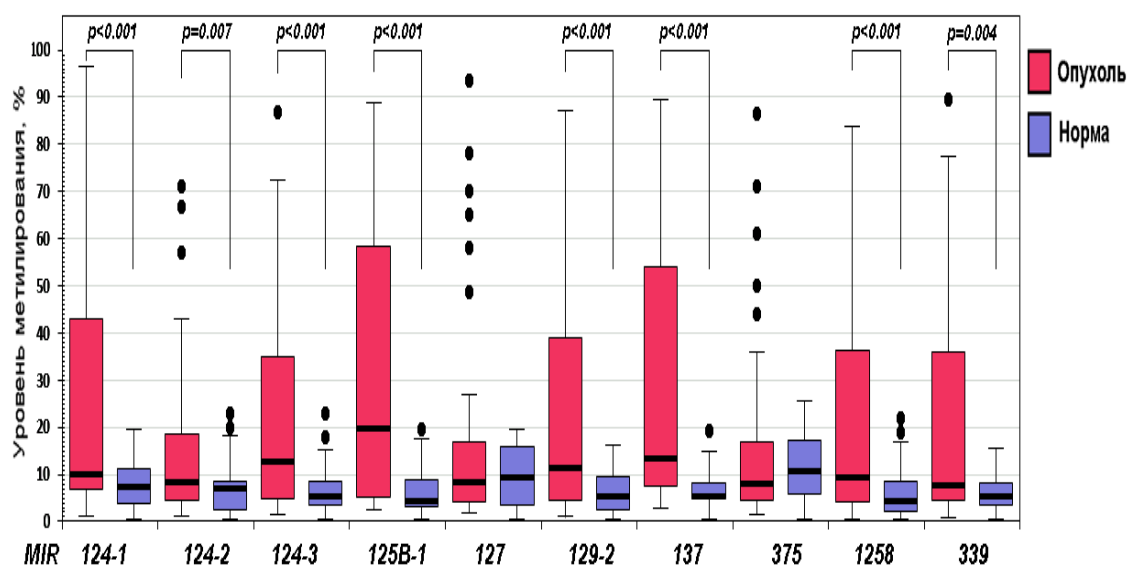


Рисунок 14. Сравнение уровня метилирования 10-ти генов миРНК в 70 парных образцах опухоли и гистологически неизменной ткани легкого при НМРЛ

Для 7 генов миРНК — *MIR124-1/3*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258* и *MIR339* было выявлено значимое увеличение уровня метилирования как в образцах ПРЛ, так и АД по сравнению с условной нормой (Губенко М.С. и др. 2022). В то же время для ПРЛ показано увеличение уровня метилирования в опухолевой ткани по сравнению с нормой для гена *MIR124-2* ($p<0.01$, $FDR\leq 0.25$). Для генов *MIR127* и *MIR375* не было выявлено значимого изменения уровня метилирования.

При сопоставлении результатов анализа изменения уровней метилирования генов миРНК только в опухолевой ткани разных гистологических подтипов НМРЛ установлено, что уровень метилирования *MIR124-2* в ткани опухоли при ПРЛ значимо выше ($p<0.01$), чем при АД (Приложение. Табл. 2). Эти данные в дальнейшем могут быть использованы для дифференцированной диагностики и лечения НМРЛ Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022. С. 5-12).

Далее данные о изменении уровня метилирования для 10-ти генов миРНК были сопоставлены с клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ (клинической стадией, степенью дифференцировки, размером опухоли, лимфогенным метастазированием, статусом курильщика). Используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни для независимых выборок,

было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования на III-IV стадии по сравнению с I-II стадией для 7 генов миРНК: *MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258*, *MIR339* ($p < 0.01$, $FDR \leq 0.25$). (Приложение. Табл. 3)

При разбиении группы образцов с НМРЛ, в зависимости от их гистологического подтипа статистически значимо высокий уровень метилирования был показан для трёх генов миРНК (*MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR127*) при АД и ПРЛ на более поздних III, IV стадиях онкологического процесса (рис. 15). Стоит отметить, что так же обнаружено специфичное метилирование отдельных генов миРНК при ПРЛ и АД. Так, для генов *MIR124-2*, *MIR129-2* и *MIR339* выявлен значимо высокий уровень метилирования на поздних стадиях при ПРЛ, а для генов *MIR137* и *MIR1258* — на поздних стадиях при АД (рис. 15) (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022, С. 5-12).

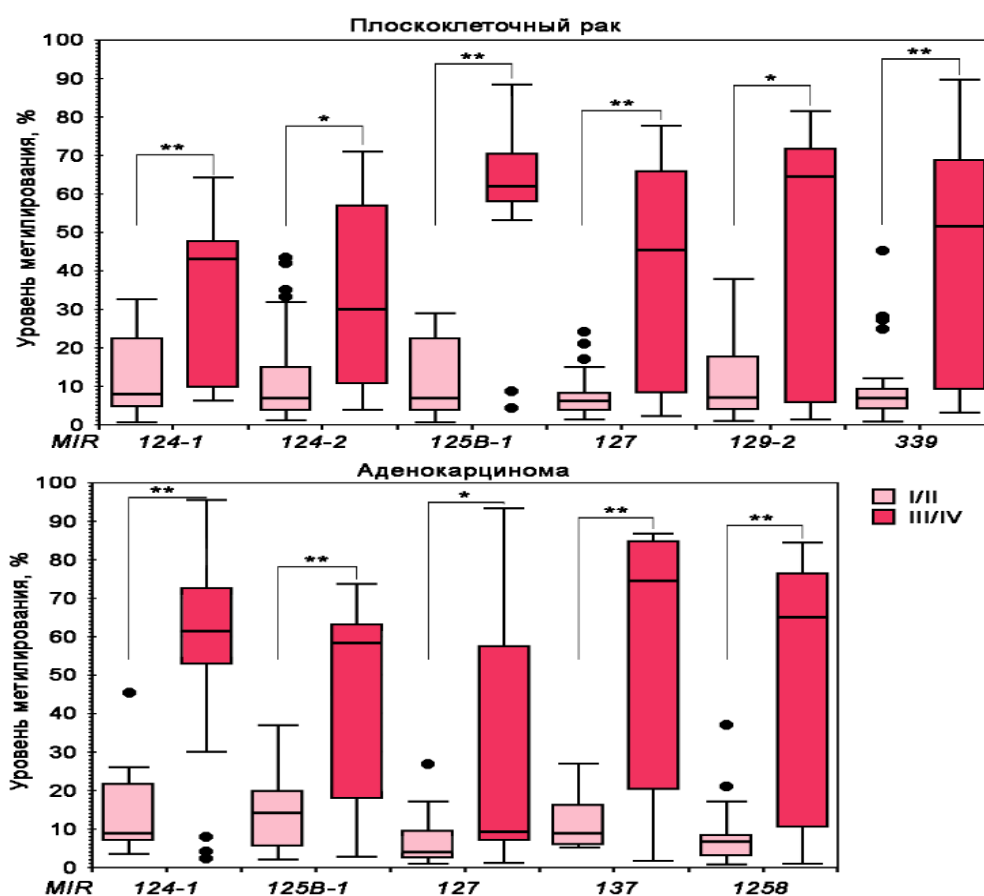
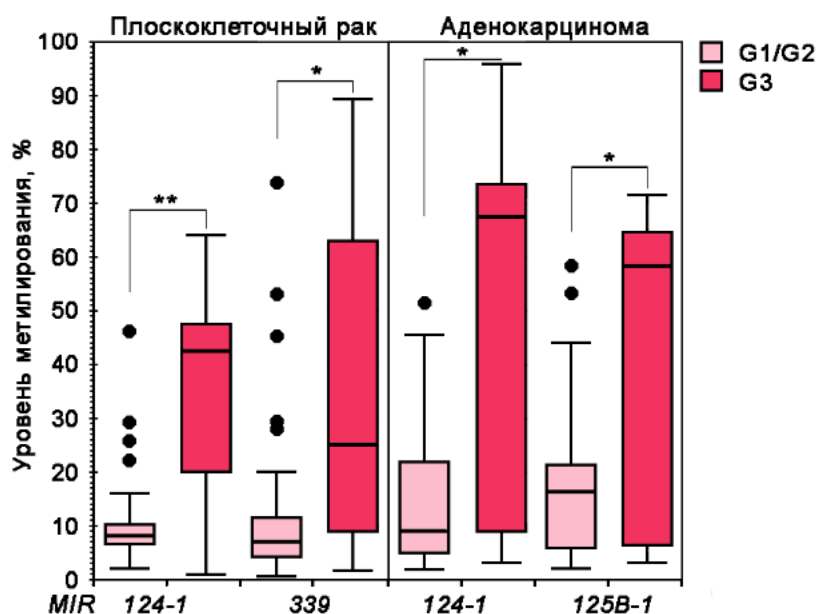


Рисунок 15. Связь уровня метилирования генов миРНК со стадией онкологического процесса. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с I-II стадией.

Стоит отметить, что при сравнении уровня метилирования генов миРНК на I, II стадии между АД и ПРЛ значимых различий выявлено не было. Однако 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 ($p < 0.01$, $FDR \leq 0.25$) (Приложение. Табл. 4) (Губенко М.С. и др. 2022).

При анализе уровня метилирования исследованных генов миРНК в зависимости от степени дифференцировки клеток НМРЛ было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования генов миРНК *MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR137* и *MIR339* при снижении степени дифференцировки (G_1/G_2 против G_3) опухолевых клеток при НМРЛ (Приложение. Табл. 5).

При сопоставлении степени дифференцировки G_1/G_2 с G_3 в отдельных гистологических типах НМРЛ было выявлено значимое увеличение уровня метилирования генов *MIR124-1* и *MIR125B-1* в G_3 при АД и *MIR124-1* и *MIR339* при ПРЛ (рис. 16) (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022, С. 5-12).



При сравнении образцов с высоким и средним уровнем дифференцировки (G_1 и G_2) между группами АД и ПРЛ значимых изменений уровня метилирования исследованных генов выявлено не было. В то же время при сравнении образцов с низкой степенью дифференцировки (G_3) в тех же группах для гена *MIR124-2* было показано значимое увеличение уровня метилирования при ПРЛ по сравнению с АД (18,75 (4,61; 57,00) против 6,23 (4,16; 7,76), $p < 0.01$, $FDR \leq 0.25$) (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022. С. 5-12).

Также мы показали, что высокий уровень метилирования 10-и генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR1258*, *MIR339*) статистически значимо связан с увеличением размера опухоли (T_1/T_2 против T_3/T_4 , $p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$) (Приложение. Табл. 6).

При сравнении уровней метилирования этих генов миРНК в гистологических подтипах НМРЛ был показана ассоциация высокого уровня метилирования промоторных районов генов *MIR124-1*, *MIR124-3*, *MIR125B-1* и *MIR339* ($p < 0,05$, $FDR \leq 0.25$) с большим размером опухоли T_3/T_4 (размер опухоли превышает 7 см) при аденокарциноме легкого. В то же время при ПРЛ выявлено увеличение уровня метилирования в опухолях большого размера для генов *MIR124-1*, *MIR124-2*, *MIR124-3*, *MIR129-2*, *MIR125B-1* и *MIR339* ($p < 0,01$; $FDR \leq 0.25$) и *MIR137* ($p < 0,05$; $FDR \leq 0.25$) (Приложение. Табл. 7).

При сравнении уровня метилирования исследованных генов в опухолях с размером T_1 (не больше 3 см) / T_2 (от 3 до 7 см) в АД и ПРЛ различий между ними выявлено не было. Однако при сравнении опухолей большого размера T_3/T_4 , показано что уровень метилирования гена *MIR124-2* статистически значимо выше в ПРЛ чем при АД (30,18 (14,85; 56,87) против 7,00 (4,6; 8,23), $p < 0,01$; $FDR \leq 0.25$).

Метастазирование в региональные лимфоузлы частое явление при онкологии различных локализаций, и рак легкого, не исключение. При обнаружении метастазов в лимфоузлах меняется стадия и, соответственно, прогноз и лечение. В нашей работе пациенты с НМРЛ и его гистологическими подтипами ПРЛ и АД были разделены на группы: N0 – нет метастазов в

региональные лимфоузлы; N1 – наличие метастазов в региональные лимфоузлы.

В результате был показан статистически значимо высокий уровень метилирования генов миРНК *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR1258*, *MIR339* ($p < 0.01$; $FDR \leq 0.25$) и *MIR124-1*, *MIR129-2* и *MIR137* ($p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$) в образцах с лимфогенным метастазированием при НМРЛ (Приложение. Табл. 8). В генах *MIR124-2*, *MIR124-3* и *MIR375* статистически значимых различий не выявлено.

При разбиении общей выборки образцов НМРЛ на группы по гистологическому признаку на АД и ПРЛ и в соответствии с наличием или отсутствием метастазов в лимфатические узлы, нами было показано, что уровень метилирования 2 генов миРНК *MIR127* и *MIR339* статистически значимо выше в образцах с лимфогенным метастазированием как при ПРЛ, так и при АД (Приложение. Табл. 9). Так же был отмечен и специфичный профиль метилирования отдельных генов миРНК. Так, для гена *MIR125B-1* выявлен значимо высокий уровень метилирования в образцах с лимфогенным метастазированием при плоскоклеточном раке легкого, а для генов *MIR124-1*, *MIR137* и *MIR1258* при аденокарциноме легкого.

При сравнении только группы пациентов N0 при ПРЛ и АД различий в уровне метилирования 10 исследованных генов найдено не было. Однако при сравнении пациентов относящихся к группе N1 показано значимое увеличение уровня метилирования гена *MIR124-1* в АД по сравнению с ПРЛ (51,62 (26,48; 69,28) против 9,84 (6,23; 42,99), $p < 0,05$; $FDR \leq 0.25$), а гена *MIR124-2* в ПРЛ по сравнению с АД (10,85 (4,97; 37,71) против 6,23 (1,81; 8,22), $p < 0,05$; $FDR \leq 0.25$).

Затем нами были изучены результаты метилирования генов миРНК в образцах опухолей с наличием или отсутствием отдаленных метастазов при НМРЛ и его гистологических подтипов. При сравнении группы пациентов без метастазов (M0) с группой пациентов с метастазами в отдаленные органы (M1) значимых отличий в уровнях метилирования всех исследованных генов

миРНК при НМРЛ и его гистологических подтипов (ПРЛ и АД) найдено не было.

Курение главная причина развития рака легкого. Период времени, в который человек курил, также важен, как и количество пачек сигарет в день которые курил пациент. Стоит отметить, что пассивное курение также увеличивает риск возникновения рака легкого, но в меньшей степени.

В результате исследования уровня метилирования 10 генов миРНК в группах курящих и некурящих больных с НМРЛ был показан статистически значимо высокий уровень метилирования гена *MIR1258* в группе не курящих пациентов (6,99 (4,02; 27,27) против 23,91 (8,93; 70,62), $p < 0,01$; $FDR \leq 0.25$). При рассмотрении отдельных гистологических подтипов НМРЛ для аденокарциномы легкого различий в уровне метилирования исследованных генов миРНК в группах курящих и некурящих пациентов найдено не было. Однако было показано значимое снижение уровня метилирования генов *MIR124-2* и *MIR375* при ПРЛ у курящих по сравнению с некурящими (рис. 17) (Логинов В.И. и др. 2022).

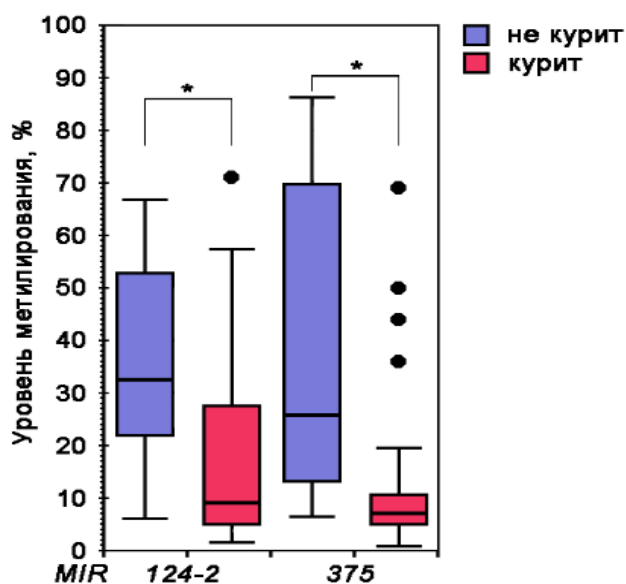


Рисунок 17. Связь уровня метилирования генов миРНК со статусом курильщика у пациентов с ПРЛ. $*p < 0.05$ по сравнению с некурящими пациентами.

Таким образом, полученные нами результаты показывают роль метилирования 10-ти исследованных генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR1258*, *MIR339*) в патогенезе и прогрессии НМРЛ и его гистологических подтипов – ПРЛ и АД.

3.2. Связь аномальной экспрессии белоккодирующих генов и миРНК с развитием НМРЛ и его гистологических подтипов

Методом ПЦР-РВ на выборке из 35 образцов НМРЛ были исследованы профили экспрессии 5-ти белоккодирующих генов (*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 регуляцию программируемой клеточной гибели. Результаты представлены на рисунке 18, и показывают во сколько раз отличается экспрессия исследованных генов в опухолевой ткани от гистологически нормальной ткани легкого того же пациента.

Далее эти данные были просуммированы для построения профиля экспрессии. В результате было найдено статистически значимое снижение уровня экспрессии мРНК гена *BAX* и повышение уровня экспрессии мРНК гена *BCL2* в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью легкого ($p < 0.001$, $FDR \leq 0.25$) (рисунок 19А).

Для миРНК (рисунок 19Б) показано статистически значимое снижение уровня экспрессии *miR-125b-5p* и *miR-375* и увеличение уровня экспрессии *miR-137* в опухолевых образцах НМРЛ по сравнению с парной гистологически нормальной тканью.

Полученные нами результаты говорят о том, что при НМРЛ ген *BAX* и миРНК *miR-125b-5p* и *miR-375* проявляют опухоль-супрессорные свойствами, в то время как ген *BCL2* и *miR-137* являются онкогенами.

А

№ Образца	APAF1	BAX	BCL2	BIM	DAPK1
23	-2,51	-1,70	5,25	2,03	-0,08
24	-1,67	-2,26	-1,67	-2,57	-1,82
25	-2,54	-3,09	-1,80	-3,62	-1,82
26	-2,39	-2,34	-0,40	-1,68	1,23
27	1,71	0,40	1,86	1,48	1,23
28	0,91	-0,62	2,23	2,18	1,97
29	-0,26	-3,09	4,88	-0,67	0,30
30	-2,11	0,15	0,15	1,44	1,22
31	-2,55	-5,49	-0,40	-3,26	-1,67
32	-0,86	-1,15	-1,49	-2,87	-3,26
33	0,33	-2,47	3,61	-0,25	4,60
34	-0,57	-0,03	1,71	1,11	1,41
35	0,23	-2,89	3,47	-1,19	1,90
36	1,07	-0,50	0,42	-0,16	-0,57
37	1,06	-0,18	1,56	0,75	0,84
38	0,61	-1,50	0,97	-1,04	-0,92
39	3,34	1,29	1,61	0,77	3,91
40	-2,03	-2,04	3,37	0,77	2,00
41	-4,02	-7,85	-0,40	-7,10	-3,49
42	1,00	-0,87	3,76	-0,04	-0,49
43	-0,11	-2,41	1,57	0,15	2,61
44	0,60	-0,63	1,59	-0,41	0,77
45	-1,72	-3,75	0,00	-3,03	-2,56
46	1,54	-0,72	2,44	1,79	3,93
47	0,23	1,80	1,44	0,91	-3,30
48	-3,85	-6,72	-1,76	-6,00	-0,04
49	-4,09	-1,26	-2,20	0,89	-2,04
50	-2,68	-2,71	4,51	-2,90	-4,66
51	2,16	-0,05	4,67	2,48	1,68
52	0,07	-2,71	4,72	0,53	2,37
53	0,32	-1,47	0,58	-0,81	-0,14
54	1,73	-5,69	-1,90	1,42	-2,94
55	0,52	-1,46	2,44	-2,90	2,18
68	-2,21	-5,15	1,73	-0,97	-2,69
69	-4,27	-3,41	-1,67	-2,03	-3,43

Б

miR-124-3p	miR-125b-5p	miR-127-5p	miR-129-5p	miR-137	miR-339-3p	miR-375
-3,94	-3,17	-1,35	0,04	-1,67	-1,09	-3,43
-4,07	-1	-2,03	-1,15	0,36	-1,6	-1,26
-1,81	-0,99	-0,67	-0,89	0,58	-1,13	-2,71
-1,35	-2,21	-1,69	-1,55	-1,41	-2	-5,69
-1,94	-0,98	-0,97	-0,86	0,32	0,22	-1,7
-0,51	-0,92	-0,06	2,52	1,77	-0,8	-4,09
0,77	-2,74	-0,69	0,79	4,51	-0,39	-4,66
-0,59	0,12	0,66	-1,34	1,65	-1,17	-3,09
-0,64	-0,2	2,53	4,12	6,39	0,11	-4,27
0,66	-0,08	1,33	0,36	3,02	0,25	1,73
-0,2	-1,49	-2,24	1,96	2,97	-0,93	-5,88
0,24	-1,54	2,03	1,59	-0,11	0,66	1,73
1,09	-1,14	-0,47	-0,74	-1,9	-1,84	-2,94
0,1	-0,43	0,89	-0,49	3,76	2,16	3,51
-0,33	-1,18	-0,56	0,16	-1,84	-0,5	-0,26
-0,36	-1,18	-0,57	0,89	-0,66	-0,12	-0,13
-1,32	-1,47	-0,41	0,64	-2,2	-2,76	-2,04
-1,57	-1,65	-2,53	-2,2	1,25	-1,59	-3,12
-0,65	-0,75	1,46	1,09	4,88	0,47	0,3
-1,29	-1,47	-0,73	0,93	-0,88	0,24	-2,68
-0,09	-0,58	-0,13	1,26	1,73	-0,22	-2,69
0,36	-2,48	-2,9	-1,66	-1,23	-0,63	2,01
-1,23	-0,35	1,42	-0,58	3,52	0,09	-0,39
0,2	-2,5	-1,39	-1,18	-0,22	-2,84	-5,15
-1,76	-0,08	-0,16	2,84	4,06	0,45	-3,41
1,29	-1,03	2,94	3,89	3,81	-0,77	3,89
1,09	-1,14	-0,47	-0,74	-1,9	-1,84	-2,94
3,23	-1,86	-0,58	3,4	0,98	-0,71	-2,51
0,64	-0,59	0,49	1,68	1,51	-0,39	-7,14
-2,41	-4,22	-1,91	-1,57	3,58	-2,11	-0,56
-0,88	0,24	-1,37	-1,91	5,25	-0,79	-0,08
-0,09	-0,58	-0,13	1,26	1,73	-0,22	-2,69
-1,32	-0,86	0,8	3,95	3,56	-0,59	-2,21
-0,33	-1,18	-0,56	0,16	-1,84	-0,5	-0,26
-0,36	-1,18	-0,57	0,89	-0,66	-0,12	-0,13

Относительный уровень экспрессии



Рисунок 18. Относительный уровень экспрессии ($\Delta\Delta Ct$) апоптоз-ассоциированных белоккодирующих генов (А) и миРНК (Б) при НМРЛ

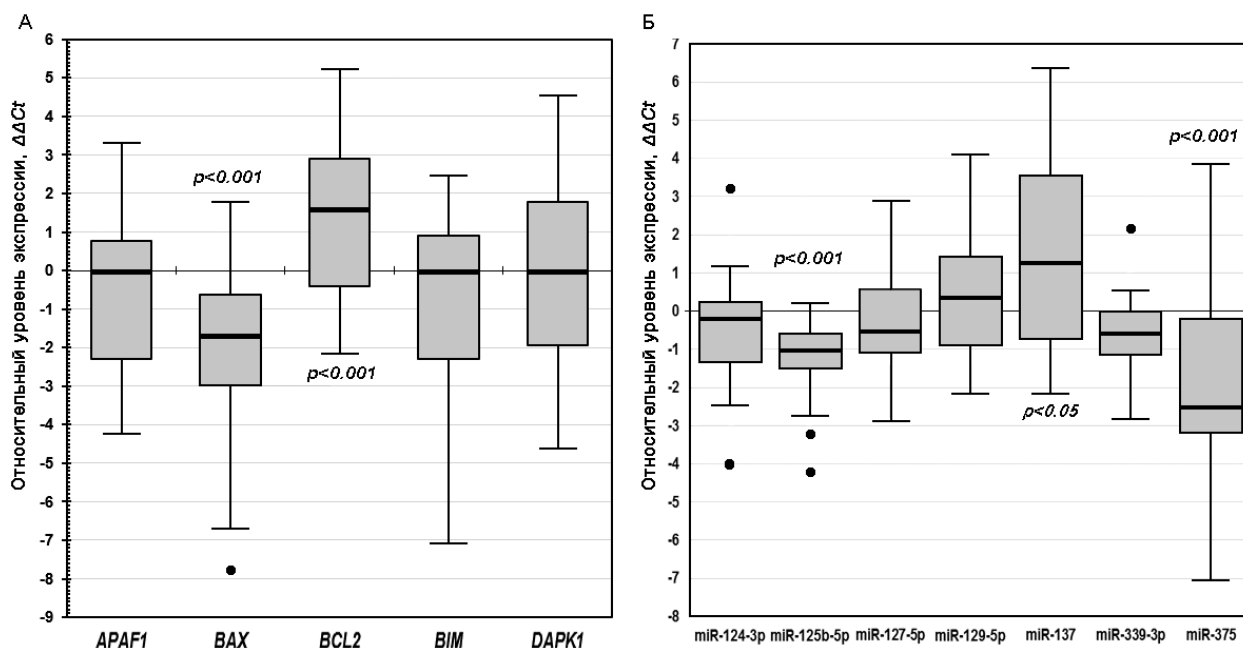


Рисунок 19. Профиль экспрессии 5-ти белоккодирующих генов (А) и 7 миРНК (Б), выраженных в значениях $-\Delta\Delta C_t$

Далее, используя непараметрический критерий Манна-Уитни для независимых выборок, был проведен анализ изменения уровня экспрессии 5-ти белоккодирующих генов и 7 миРНК в зависимости от клинко-морфологических параметров НМРЛ (клиническая стадия, степень дифференцировки, размер опухоли, лимфогенное метастазирование, метастазы в другие органы, статус курильщика).

Показано статистически значимое снижение уровня экспрессии мРНК гена *BAX* в образцах с более тяжелой (III+IV) стадией онкологического процесса) и лимфогенным метастазированием ($p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$) (рисунок 20А). Для остальных белоккодирующих генов *APAF1*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* значимых результатов выявлено не было.

При анализе изменения уровня экспрессии 7 миРНК в зависимости от клинко-морфологических параметров НМРЛ, был выявлен единственный статистически значимый результат – для *miR-137* показано значимое снижение уровня экспрессии в образцах опухоли большого размера (размер опухоли превышает 7 см) ($p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$) (рисунок 20Б).

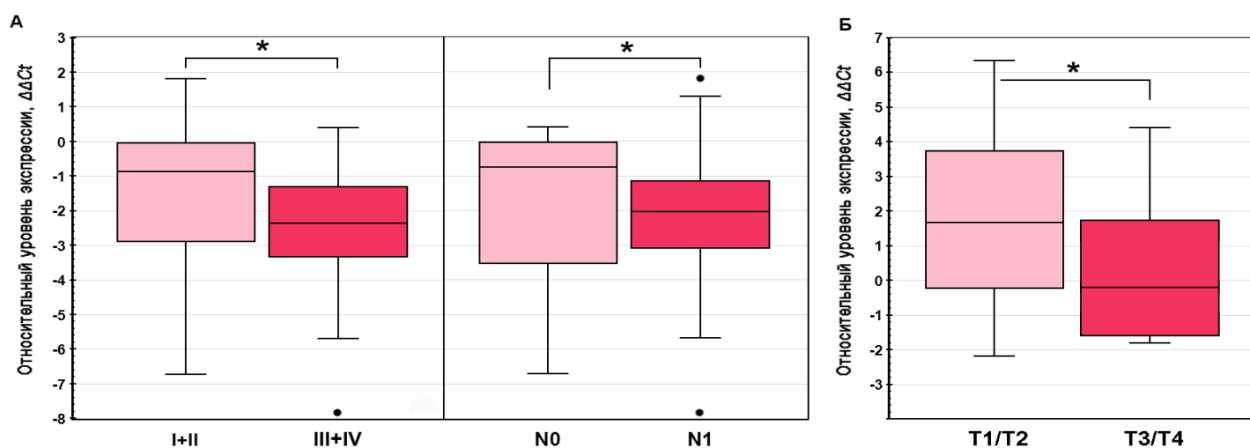


Рисунок 20. Уровни экспрессии мРНК гена *BAX* (А) и миРНК *miR-137* (Б), выраженные в значениях $-\Delta\Delta C_t$; $*p < 0.05$

3.3. Роль aberrantного метилирования в нарушение экспрессии мРНК генов *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* и 9-ти генов миРНК при НМРЛ

Используя коэффициент корреляции Спирмена (R_s) при анализе сравнения уровня метилирования и 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 НМРЛ были получены следующие данные.

Показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением уровня метилирования промоторных CpG-островков и уровнем их экспрессии для генов *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *DAPK1*. Так, для гена *BCL2* было показано, что со снижением уровня метилирования в опухолевой ткани происходит статистически значимое ($R_s = -0,374$, $p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$) увеличение уровня экспрессии его мРНК (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022. С. 5-12). Для гена *BIM* статистических значимых данных выявлено не было. На рисунке 21 представлены корреляционные зависимости между уровнем экспрессии мРНК и уровнями метилирования генов *APAF1*, *BAX*, *DAPK1* у больных НМРЛ.

Для исследованных генов мiРНК 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 гиперметилирование в опухоли является биологическим маркером изменения уровня экспрессии мРНК белоккодирующих генов (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022, С. 5-12).

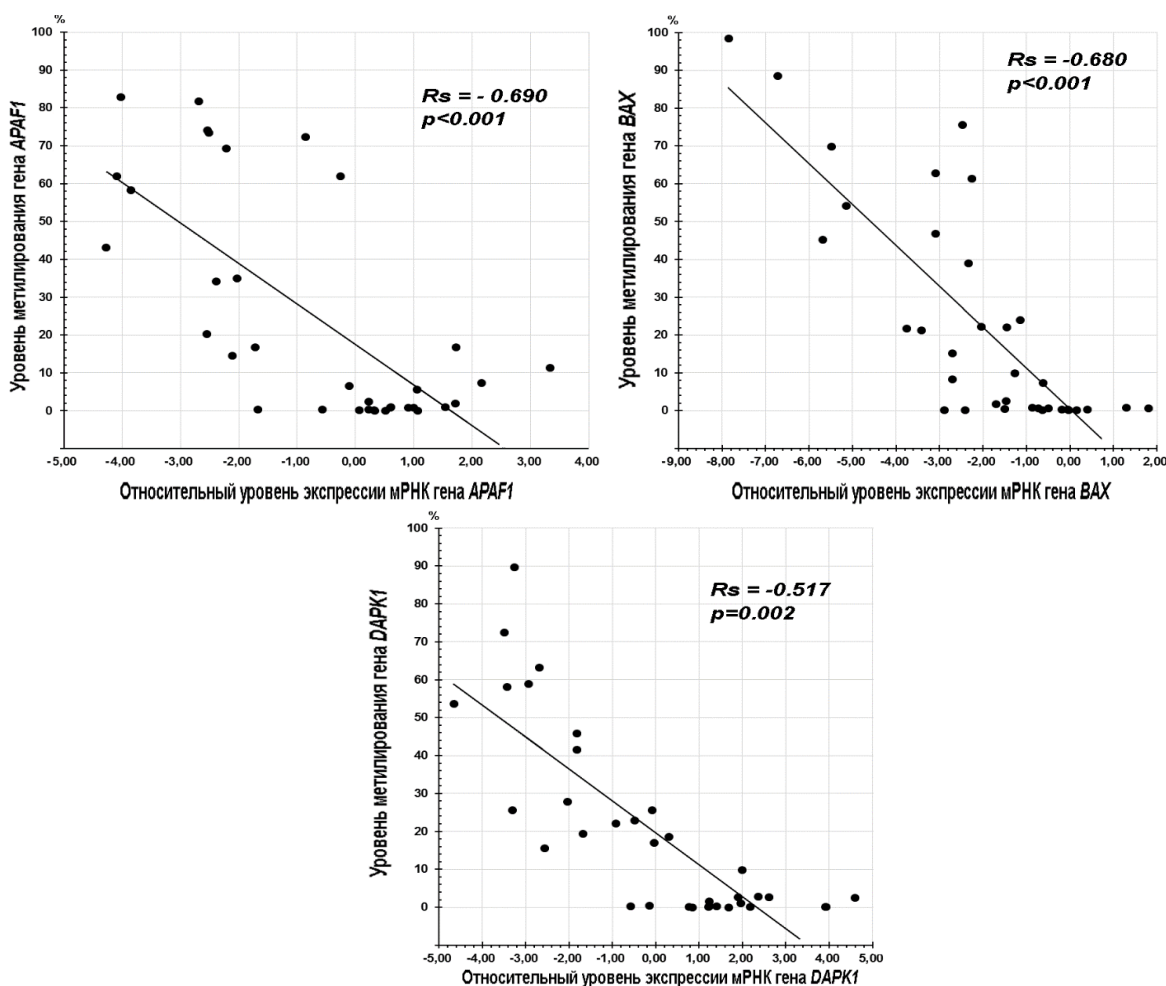


Рисунок 21. Связь между экспрессией мРНК и метилированием ДНК для белоккодирующих генов. По оси абсцисс – уровни экспрессии мРНК, определенные с помощью количественного анализа RT-PCR. По оси ординат – уровень метилирования ДНК (%) для каждого конкретного образца, исследованного с помощью количественной МС-ПЦР. Коэффициент

корреляции Спирмена R_s и p – значение (двустороннее) корреляции отображаются в правом верхнем углу каждого графика

3.4. Поиск взаимодействий миРНК – ген-мишень при НМРЛ

Хотя высокий уровень метилирования промоторных CpG-островков белоккодирующих генов часто признается основной причиной инактивации того или иного гена, часто белки, кодируемые этими генами, могут экспрессироваться и при наличии гиперметилирования в первичных тканях и клеточных линиях. Например, неоднократно сообщалось и о потере экспрессии мРНК генов *DAPK1* и *APAF1*, в отсутствие гиперметилирования их промоторов, или для гена *BCL2* при деметилировании, в опухолях разных локализаций, что указывает на существование дополнительных уровней их регуляции в опухолях, включая посттранскрипционную регуляцию.

Поэтому, нами было проведено сопоставление данных по изменению уровня экспрессии 5-ти белоккодирующих генов *APAF1*, *BAX*, *BCL2*, *BIM*, *DAPK1* и 7-ми миРНК (miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-129-5p, miR-137, miR-339-3p, miR-375), для которых эти белоккодирующие ген могут быть потенциальными генами-мишенями. Данные о возможной взаимосвязи между миРНК и белоккодирующими генами были получены по результатам анализа базы miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>).

В результате анализа полученных данных и оценки их конкордантности, с помощью коэффициента корреляции Спирмена, были сформированы 7 пар миРНК – мРНК ген-мишень (Рисунок 22).

Таким образом, полученные нами статистически значимые результаты позволяют предполагать прямое воздействие миРНК miR-125b-5p, miR-127-5p, miR-339-3p, miR-375 на изменение уровня экспрессии мРНК белоккодирующих генов *BCL2*, *BIM*, *DAPK1*, что согласуется с известным механизмом подавления экспрессии белоккодирующих генов под действием миРНК.

Также нами была проанализирована возможность опосредованного влияния метилирования промоторных районов генов миРНК (*MIR124-1*, *MIR124-2*, *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*,

MIR1258, MIR339) на изменение уровня экспрессии мРНК белкокодирующих генов *APAF1, BAX, BCL2, BIM, DAPK1*. Статистически значимых значений результатов получено не было.

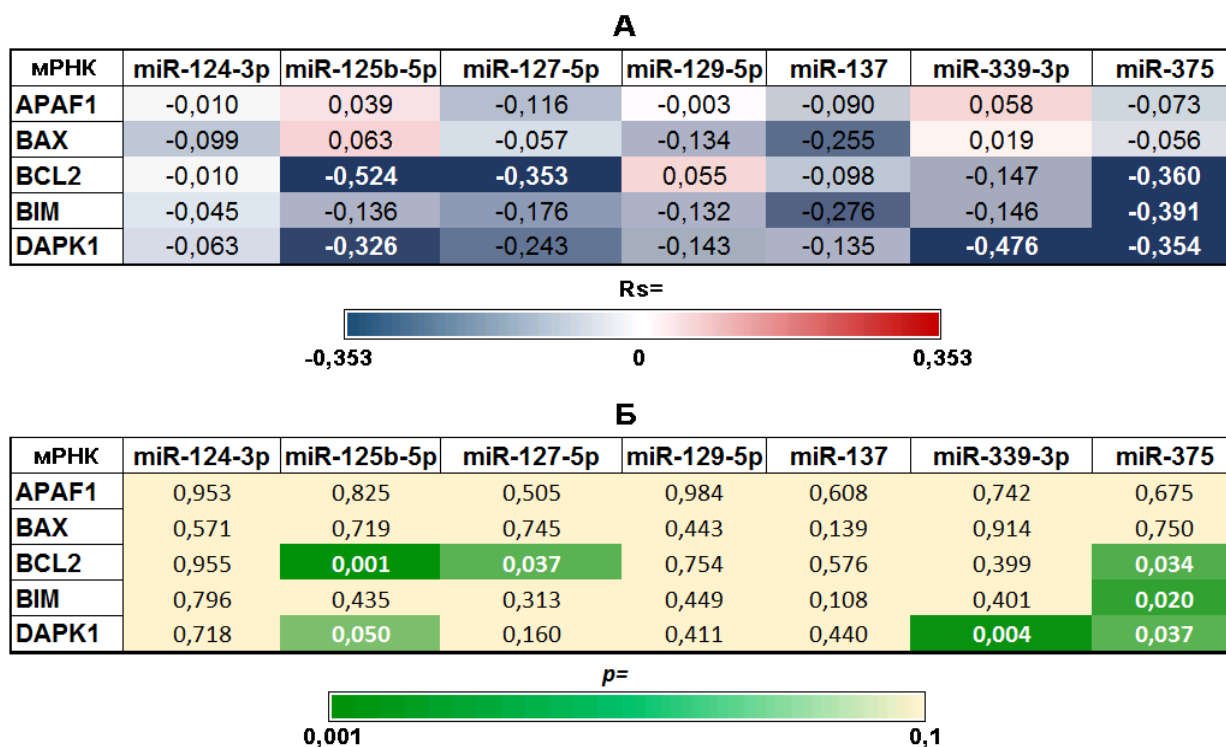


Рисунок 22. Потенциально-взаимодействующие пары миРНК – ген-мишень при НМРЛ; коэффициент корреляции Спирмена – Rs (А); статистическая значимость – $p=$ (Б).

3.5. Метилирование генов миРНК – новый маркер для диагностики и прогноза НМРЛ

В настоящее время, инструментальные, биохимические, гистологические исследования биопсийного и/или резекционного материала являются основными методами диагностики эпителиальных опухолей разных локализаций. Однако, они не всегда позволяют уверенно установить диагноз. Молекулярно-генетические методы позволяют определить стадию заболевания, дать оценку степени риска развития метастазов, прогностически предсказать ответ на химиотерапию, а также общий прогноз развития болезни.

Из-за того, что большинство миРНК являются тканеспецифичными, и соответственно связаны с типом опухоли, использование миРНК в качестве диагностического инструмента можно считать обоснованным.

Поэтому нами была проведена оценка диагностического потенциала для исследованных генов миРНК – *MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR1258*, *MIR339*.

Для этого, количественные значения метилирования исследованных генов миРНК дихотомизировали путем установки порогового значения уровня метилирования. Порог был установлен, чтобы снизить уровень ложноположительных результатов (Lehmann U. et al., 2005) и рассчитывался по формуле:

пороговый уровень = $N(\text{mean}) + 2SD$, где SD – стандартное отклонение, $N(\text{mean})$ – средний уровень метилирования в ткани легкого у людей без онкологии.

Работа по определению пороговых значений была выполнена ранее в лаборатории патогеномики и транскриптомики «НИИОПП».

Полученные в результате дихотомизации суммированные данные представлены виде частот метилирования исследованных генов на выборке из 70 парных образцов НМРЛ (Приложение. Табл. 10).

Далее каждый ген миРНК был охарактеризован с целью оценки его диагностического потенциала. Была проведена оценка чувствительности (Se) и специфичности (Sp) маркера, а также его качество как диагностического маркера (AUC) (Приложение. Табл. 11). Количественную интерпретацию ROC даёт показатель AUC (0,5-1). Значение 0,5 соответствует бесполезности маркера. Значение 1 соответствует идеальному маркеру.

В результате анализа полученных данных были отобраны гены, имеющие наибольший диагностический потенциал для диагностики немелкоклеточного рака легкого: *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR137*, *MIR1258* и *MIR339*. 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 немелкоклеточного рака легкого (рис. 21А, Б). Первая диагностическая панель состоит из трех маркеров: *MIR125B-1*, *MIR1258* и *MIR339* ($Se = 92,7$; $Sp = 85,8$; $AUC = 0,967$; $p < 10^{-5}$) (рис. 23А). Для усиления диагностического потенциала панели было решено использовать 4 маркера. В результате 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. 23Б). Для достижения указанных параметров необходимо обнаружение метилирования двух из предложенных генов. Таким образом, предложенные нами панели маркеров могут быть потенциально применимы для диагностики НМРЛ, при анализе, как послеоперационного, так и биопсийного материала.

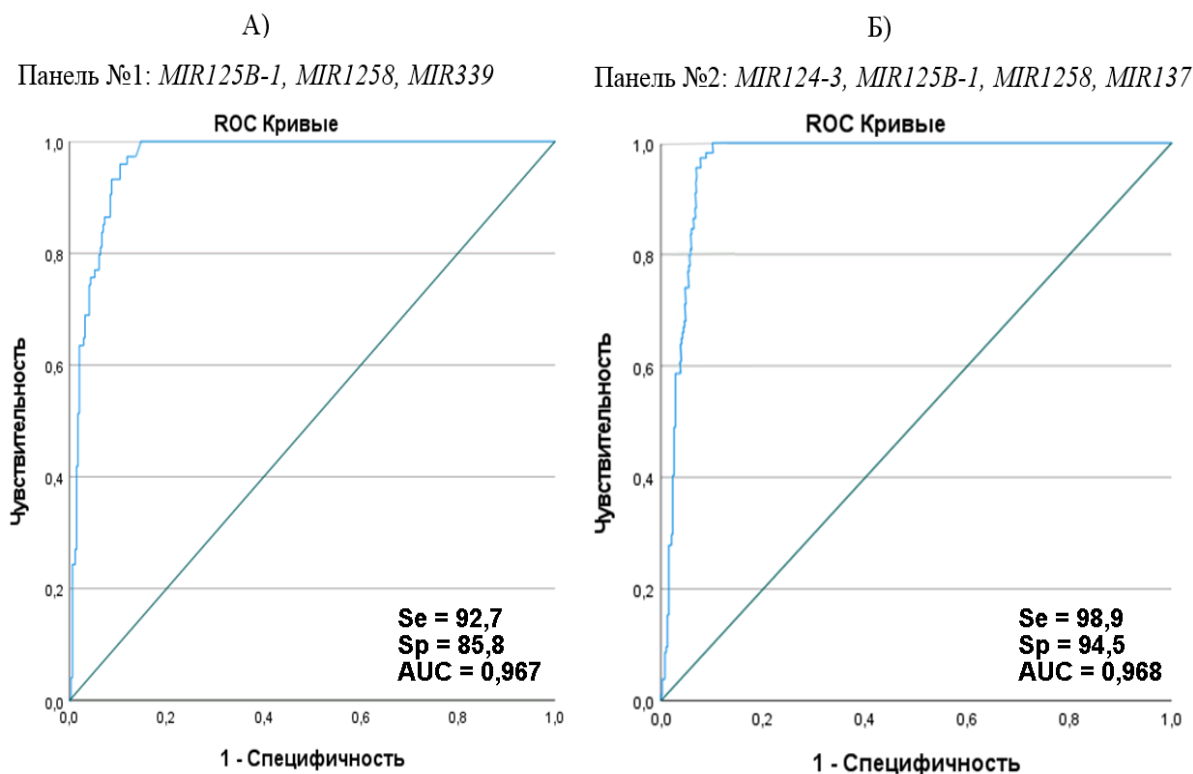


Рисунок 23. ROC-анализ систем маркеров для диагностики немелкоклеточного рака легкого. А – панель из 3-х маркеров: *MIR125B-1*, *MIR1258* и *MIR339*; Б – панель из 4-х маркеров: *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR137*, и *MIR1258*. *Se* – чувствительность маркера; *Sp* – специфичность маркера.

3.6. Влияние аномального метилирования и экспрессии генов *DAPK1*, *APAF1*, *BIM*, *BAX*, *BCL2* и миРНК на патогенез немелкоклеточного рака легкого

В настоящей работе было изучено несколько эпигенетических механизмов, участвующих в регуляции уровня экспрессии опухоль-ассоциированных генов *DAPK1*, *APAF1*, *BIM*, *BAX* и *BCL2* при НМРЛ. К этим механизмам относятся, метилирование промоторных CpG-островком самих генов и изменение уровня экспрессии миРНК, для которых эти гены являются мишенями. Так же нами был исследован уровень метилирования самих генов миРНК и его влияние на уровень экспрессии как миРНК, так и белоккодирующих генов.

Ранее имелись сообщения о аномально высоком уровне метилирования генов *DAPK1* и *APAF1* и его связи с инактивацией этих генов, в некоторых видах опухолей, в том числе и при НМРЛ (Chen Z. et al. 2022; Daniunaite K. et al., 2020) и эти данные нашли подтверждение в нашей работе (Губенко М.С. и др. ПФИЭМ., 2022, С. 5-12).

В тоже время, однозначных данных о роли метилирования в регуляции экспрессии мРНК гена *BCL2* при НМРЛ очень мало, и они крайне противоречивы. Так в одних работах отмечено гиперметилирование промоторной области гена *BCL2* в образцах опухоли по сравнению с прилегающей гистологически нормальной ткани (Pargol M. et al., 2021), в других – деметилирование этого гена в опухоли (Zhao Y. et al., 2013). В нашей работе мы показали, что деметилирование гена *BCL2* (нормальная ткань (медиана 0.5%, диапазон 0.0-0.9%) против опухоли (медиана 2.0%, диапазон 0.9-26.3%); $p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$), более характерно для НМРЛ. Стоит отметить, что в литературе имеются единичные работы, о связи низкого уровня метилирования гена *BCL2* в опухолевой ткани с его гиперэкспрессии (Lokk K. et al., 2012), что так же нашло подтверждение в нашей работе. Так было показано, что со снижением уровня метилирования промоторного CpG-

островка гена *BCL2* в опухолевой ткани происходит статистически значимое ($R_s = -0,374$, $p < 0.05$, $FDR \leq 0.25$) увеличение уровня экспрессии его мРНК.

Неоднозначный результат получен нами для гена *BIM*. Хотя нами показано статистически значимое повышение уровня метилирования этого гена в опухоли, что косвенно подтверждается работами зарубежных авторов, выполненных при других видах онкологии (San José-Eneriz E. et al., 2009; Richter-Larrea J.A. et al., 2010), мы не нашли связи между уровнем метилирования этого гена с изменением его экспрессии. Что возможно связано с тем, что для данного гена в образцах НМРЛ основным способом инактивации активности, является ацетилирование гистонов (Zhao M. et al., 2018). В связи с этим, для более однозначного вывода о роли метилирования в регуляцию экспрессии гена *BIM* требуется более расширенное исследование.

В нашей работе **впервые** показано статистически значимое увеличение уровня метилирования гена *BAX* в образцах НМРЛ по сравнению с прилегающей нормальной тканью легкого. А также показана статистически значимая связь между гиперметилированием гена *BAX* и снижением уровня его экспрессии. Информации, подтверждающей или опровергающей данные результаты в зарубежной литературе (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, март 2023) не обнаружено.

Таким образом, полученная нами статистически значимая корреляция между уровнями экспрессии мРНК и уровнями метилирования генов *BAX*, *APAF1*, *DAPK1* и *BCL2*, позволяет говорить о том, что высокий уровень метилирования в опухоли является биологическим маркером изменения экспрессии мРНК исследованных генов. Этот результат согласуется как с данными зарубежных исследователей, полученными для других генов при НМРЛ, так и данными, полученными в нашей лаборатории для других видов онкологии (Yang S. et al., 2022; Pronina I.V. et al., 2016; Loginov V.I. et al. 2015).

Важный вклад в регуляцию экспрессии генов миРНК вносит метилирование их промоторных CpG-островков (Чикунев И.Е., Набока А.В. 2016; Kunej T. et al., 2011), к тому же метилирование генов миРНК может стать

хорошим диагностическим и прогностическим маркером опухолевого процесса. Поэтому нами был оценен статус метилирования генов миРНК.

В нашей работе показан аномально высокий уровень метилирования 8-ми генов миРНК (*MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258* и *MIR339*) при НМРЛ, причем, о гиперметилировании *MIR339* при НМРЛ ни где ранее не упоминалось (Губенко М.С. и др. РМБВ., 2022 С. 123-131). Так данные о высоком уровне метилирования гена *MIR129-2* в опухоли нашли подтверждение в работах других авторов выполненных не только при НМРЛ (Логинов В.И. и др., 2015; Wang H. et al., 2015), но и других видах онкопатологии, например, раке яичников, при котором высокий уровень метилирования этого гена коррелировал с плохой выживаемостью (Loginov V.I. et al., 2022).

Так же нами выявлены как общие, так и специфические профили метилирования генов миРНК для разных гистотипов НМРЛ. Для 7 из 10 генов микроРНК показано изменение уровня метилирования при АД и ПРЛ, и лишь для *MIR124-2* только при ПРЛ (Губенко М.С. и др. РМБВ., 2022 С. 123-131). Также следует отметить, что выявленное нами увеличение уровня метилирования гена *MIR1258* в опухолевой ткани при ПРЛ согласуется с ранее полученными данными (Рыков С.В. и др., 2013). Полученные данные дополняют исследования, проведенные ранее на выборках с малым количеством образцов НМРЛ (Логинов В.И. и др., 2018. Логинов В.И. и др., 2015; Tan W. et al., 2015) и отражают важную роль метилирования изученных генов миРНК в патогенезе НМРЛ и его гистологических подтипов.

Хотя считается, что метилирование промоторного CpG-островка может регулировать уровень экспрессии гена, однако для исследованных генов миРНК и кодируемых ими 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*) корреляций между изменениями метилирования и уровнем экспрессии выявлено не было.

Изменение уровня метилирование генов лежит в основе прогрессии любой опухоли, в том числе НМРЛ. Увеличение размера опухоли, снижение уровня дифференцировки клеток, прорастание в лимфатические узлы, распространение с лимфотоком – и кровотоком, диссеминация по всему организму во всех этих процессах участвуют гены, инактивация которых завязана на метилирование их промоторных CpG-островков.

Нами в этом исследовании было показано, что метилирование промоторных CpG-островков белоккодирующих генов *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *APAF1* и генов миРНК *MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258*, *MIR339* коррелирует с клинической стадией, описывающей весь комплекс патоморфологических признаков опухолевого процесса. Эти данные существенно дополняют результаты, полученные при исследовании малых выборок НМРЛ. Так, например в работе (Tan W. et al., 2015) показано, что уровень метилирования *MIR127* значительно выше при более высоких стадиях (III и IV) опухоли, чем при более низких (I и II) ($p=0.039$).

При рассмотрении отдельных гистологических подтипов НМРЛ был показан значимо высокий уровень метилирования трёх генов миРНК (*MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR127*) как при АД, так и ПРЛ на более поздних III, IV стадиях онкологического процесса (Губенко М.С. и др. РМБВ., 2022 С. 123-131). Однако отмечен и специфичный профиль метилирования отдельных генов миРНК на поздних стадиях онкопроцесса. Так, показано гиперметилирование генов *MIR124-2*, *MIR129-2* и *MIR339* при ПРЛ, генов *MIR137* и *MIR1258* при АД. Следует отметить, что ранее уже были выявлены существенные различия в метилировании генов миРНК при разных патоморфологических состояниях НМРЛ. Так, в работе (Kim Y.H. et al., 2017) частота метилирования генов *MIR34B/C* была выше в группе ПРЛ, чем в группе АД. Стоит отметить, то что уровень метилирования и его профиль для генов миРНК меняются сильнее всего именно на поздних стадиях. Так при сравнении двух гистологических типов рака лёгкого на III, IV стадиях онкологического процесса наблюдался значимо более высокий уровень метилирования генов *MIR125B-1* и *MIR127*

при ПРЛ, а *MIR124-1* при АД ($p < 0.01$) (Губенко М.С. и др. РМБВ., 2022 С. 123-131). Похожие изменения уже были показаны при раке лёгкого для гена *MIR7* (Rodríguez-Antolin C. et al., 2019).

При рассмотрении отдельных патоморфологических признаков опухолевого процесса нами был показан статистически значимый рост уровня метилирования генов *DAPK1*, *BIM*, *APAF1*, *MIR124-1/2/3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258*, *MIR339*, *MIR375* с увеличением размера опухоли; генов *DAPK1*, *BAX*, *APAF1*, *MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR1258*, *MIR339*, – с лимфогенным метастазированием при НМРЛ (Губенко М.С. и др. РМБВ., 2022 С. 123-131), что подтверждается данными литературы (Min L. et al., 2018; Zhou Z. et al., 2019; Heller G. et al., 2018; Kang N. et al., 2015).

При рассмотрении возможного вклада изменения уровня метилирования исследованных генов в дедифференцировку опухолевых клеток, было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования гена *BAX* и генов миРНК *MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR137* и *MIR339* при снижении степени дифференцировки (G1/G2 против G3/G4) опухолевых клеток при НМРЛ (Губенко М.С. и др. РМБВ., 2022 С.123-131).

НМРЛ можно считать «контактным» видом рака, так как с вдыхаемым воздухом поступают различные «отравляющие» канцерогенные вещества. Одним из таких комплексных отравляющих веществ можно считать сигаретный дым, провоцирующий развитие рака. Поэтому нами была проведена оценка связи уровня метилирования исследованных генов со статусом курильщика у пациентов с НМРЛ. Однако мы не смогли показать, что сигаретный дым провоцирует увеличение уровня метилирования исследованных генов. Нами было выявлено противоположное. Показано статистически значимое снижение уровня метилирования генов *BAX* и *MIR1258* в образцах опухоли у курящих пациентов по сравнению с некурящими на общей выборке образцов НМРЛ. При рассмотрении отдельно групп пациентов с АД и ПРЛ, отличий в уровне метилирования

исследованных генов у пациентов с АД выявлено не было. Однако было показано значимое снижение уровня метилирования генов *MIR124-2* и *MIR375* при ПРЛ у курящих по сравнению с некурящими (Губенко М.С. и др. 2022 и др., ПФиЭМ 2022., С.5-12). Эта особенность впервые была отмечена в работе учёных из Таиланда при исследовании изменения уровня метилирования в образцах плоскоклеточного рака другой этиологии (Puttipanyalears C. et al., 2013). Можно предположить, что данный эффект связан с механизмами развития плоскоклеточного подтипа рака у курильщиков.

При рассмотрении изменения экспрессии белоккодирующих генов в зависимости от клинико-патоморфологических особенностей НМРЛ, какие-либо изменения были отмечены только для гена *BAX* и эти изменения коррелировали с уровнем метилирования этого гена. Так показано увеличение уровня метилирования гена *BAX* в образцах опухоли с наличием метастазов в лимфатические узлы и тяжелой стадией онкологического процесса по сравнению с образцами опухоли без оных, при этом показатели уровня экспрессии мРНК *BAX* ($p < 0.01$) статистически значимо снижались (Губенко М.С. и др. 2022 и др., ПФиЭМ 2022., С.5-12). Таким образом, можно предположить, что метилирование данного гена является важным маркером прогрессии НМРЛ. В нашей (Губенко М.С. и др., ПФиЭМ 2022., С.5-12). нам не удалось выявить значимых изменений в уровнях экспрессии у генов *DAPK1*, *BCL2*, *BIM*, *APAF1*, связанных с прогрессией НМРЛ, но в некоторых работах зарубежных авторов, показано, что высокий уровень метилирования гена *DAPK1* не только связан с развитием метастазов, но и с плохим прогнозом у пациентов с НМРЛ (Zhang J. et al., 2015).

Основываясь на данных об изменении уровня метилирования исследованных генов, в нашей работе были разработаны потенциальные диагностические и возможно прогностические панели маркеров для НМРЛ. Белоккодирующие гены не смогли показать приемлемый диагностический значимости ($AUC < 0.5$). В тоже время с использованием генов миРНК нами были подобраны две системы маркеров с высоким диагностическим

потенциалом для раннего выявления НМРЛ и возможно коррекции его лечения. Так, одна из панелей, состоящая из трех маркеров – *MIR125B-1*, *MIR1258*, *MIR339*, может рассматриваться в качестве потенциальной диагностической панели для НМРЛ с устойчивыми характеристиками: $Se = 92.7\%$, $Sp = 85.8\%$ и $AUC = 0,967$ в исследуемой выборке. В то же время вторая панель из 4 маркеров (*MIR125B-1*, *MIR1258*, *MIR137*, *MIR124-3*) может быть предложена не только как диагностическая панель, но и в качестве потенциальной системы для отслеживания эффективности лечения: $Se = 98.9\%$, $Sp = 94.5\%$, $AUC \sim 0,97$. Ранее в нашей лаборатории была составлена похожая панель, также состоящая из 4-х маркеров (*MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR137*, *MIR375*), однако уровень ее чувствительности и специфичности был ниже (Ходырев Д.С. и др., 2012). Стоит, однако, подчеркнуть, что полученные нами панели маркеров требует дополнительной всесторонней оценки и верификации в клинике.

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют роль метилирования исследованных белоккодирующих и генов миРНК патофизиологических процессах, приводящих к прогрессии НМРЛ, показывают диагностический потенциал этих генов, говорят о том, что метилирование промоторных CpG-островков генов *BAX* и *APAF1*, является главной причиной инактивации экспрессии этих генов при НМРЛ.

Еще одним важнейшим эпигенетическим механизмом, влияющим на изменение уровня активности белоккодирующих генов в нормальных клетках, и как следствие приводящим к онкологическому процессу, является изменение уровня экспрессии миРНК.

В нашей работе, выполненной на выборке из 35 парных образцов НМРЛ были сопоставлены данные по изменению уровня экспрессии как белоккодирующих генов, так и генов миРНК. В результате был составлен ряд пар миРНК – мРНК ген мишень: miR-125b-5p – *BCL2* ($R_s = -0,524$, $p = 0,001$); miR-127-5p – *BCL2* ($R_s = -0,353$, $p = 0,037$); miR-375 – *BCL2* ($R_s = -0,360$, $p = 0,034$); miR-375 – *BCL2L11/BIM* ($R_s = -0,391$, $p = 0,02$); miR-125b-5p – *DAPK1*

($R_s = -0,326$, $p = 0,05$); miR-339-3p – DAPK1 ($R_s = -0,476$, $p = 0,004$); miR-375 – DAPK1 ($R_s = -0,354$, $p = 0,037$), позволяющих говорить о вкладе миРНК в регуляцию исследованных белкокодирующих генов. Возможным результатом такого взаимодействия может стать, как блокирование опухолевого процесса и стимуляция программируемой клеточной гибели из-за инактивации экспрессии гена *BCL2*. Этот результат нашел свое подтверждение в литературе (Gong J. et al. 2013). В этой работе выполненной на клеточных линиях различных видов онкологии, в том числе и рака легкого, было показано, что высокий уровень экспрессии miR-125b-5p может инициировать апоптоз путем подавления анти-апоптотических молекул MCL1 BCL2, SIRT, а подавление miR-125b-5p может способствовать развитию опухоли, придавая клеткам способность выживать в условиях лишения питательных веществ и химиотерапевтического лечения.

В то же время инактивация генов *DAPK1* и *BCL2L11/BIM* под действием миРНК может приводить к блокированию проведению сигналов «смерти клетки» и отключению митохондриального пути апоптоза. В частности, в литературе: для гена *BCL2L11/BIM* показано взаимодействие с miR-92a, которая провоцирует пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток при раке толстой кишки (Zaki A. et al., 2022), а для гена *DAPK1* с miR-191-5p при раке молочной железы (Majed S.O., 2022).

Следует подчеркнуть, что данных о взаимодействии miR-127-5p, miR-339-3p, miR-375 с мРНК генов *BCL2*, *BCL2L11/BIM*, *DAPK1* при НМРЛ не выявлено (PubMed, апрель 2023). Однако, в ряде работ показано, что высокий уровень экспрессии miR-127-5p приводит к активации апоптоза, блокированию клеточного цикла, клеточной миграции и инвазии при раке желудка, молочной железы и др., например, через взаимодействие с онкогеном BCL6 [Chen J. et al., 2019]. В другой работе [Gan T.Q. et al., 2017] был оценен вклад миРНК miR-375 в прогрессию рака легкого и показано ее взаимодействие с рядом генов-мишеней (*PAX6*, *RHOJ*, *IGF1R* и др.), которые играют важную роль при апоптозе, эпителиально-мезенхимальном переходе,

миграции инвазии клеток. Для миРНК miR-339 показана тесная связь изменения уровня экспрессии с инактивацией ферроптоза, через взаимодействие с мРНК гена *SLC7A1* (Zhang N. et al., 2022) при аденокарциноме легкого.

Таким образом, полученные нами взаимодействующие пары миРНК – мРНК ген-мишень, скорее всего связаны с регуляцией процессов программируемой клеточной гибели, протекающими в нормальной и/или опухолевой клетке. Однако, эти результаты, требуют дополнительного подтверждения *in vitro* и *in vivo*.

В заключение, полученные нами результаты способствуют расширению представлений о роли метилирования ДНК и изменении экспрессии миРНК в регуляции активности опухоль-ассоциированных белоккодирующих генов. Демонстрируют важную роль гиперметилирования промоторных районов белоккодирующих генов и генов миРНК в возникновении и прогрессировании НМРЛ и его гистологических подтипов, предлагают новые потенциальные биомаркеры диагностики и прогноза, а возможно и новые терапевтические мишени для создания новых лекарственных средств.

ВЫВОДЫ

1. В опухолевой ткани у пациентов с НМРЛ установлено патологическое изменение уровня метилирования промоторных CpG-островков 5 белоккодирующих генов (*DAPK1*, *BCL2*, *VIM*, *BAX*, *APAF1*) 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*, *VIM*, *BAX*, *APAF1*.
4. Показана статистически значимая корреляция между изменением уровня метилирования ДНК в промоторных районах генов *DAPK1*, *BCL2*, *BAX*, *APAF1* 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*, *VIM*, *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)

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1. Уровень метилирования исследованных генов миРНК в разных гистологических типах НМРЛ; *Me (Q1-Q3), %*.

Гены микроРНК	ПРЛ, N=39		АД, N=31	
	Норма	Опухоль	Норма	Опухоль
<i>MIR124-1</i>	8,66 (4,07; 11,54)	9,82** (6,52; 37,51)	7,12 (3,25; 9,56)	21,61** (8,18; 53,17)
<i>MIR124-2</i>	7,33 (3,47; 8,27)	15,03** (5,54; 33,75)	6,06 (2,36; 10,57)	6,23 (3,46; 8,87)
<i>MIR124-3</i>	6,73 (3,56; 9,65)	15,05** (5,43; 33,77)	5,62 (3,82; 7,63)	9,29** (3,09; 34,28)
<i>MIR125B-1</i>	6,79 (3,87; 9,76)	22,44** (4,82; 58,33)	4,43 (1,58; 5,67)	19,09** (6,05; 56,76)
<i>MIR127</i>	9,13 (3,74; 15,52)	8,10 (5,62; 18,35)	15,18 (3,95; 17,14)	7,34 (3,08; 16,55)
<i>MIR129-2</i>	5,89 (3,31; 8,95)	7,32** (4,49; 37,85)	7,01 (1,68; 11,35)	16,66** (5,14; 40,72)
<i>MIR137</i>	6,02 (4,3; 7,76)	15,89** (7,58; 37,41)	6,68 (5,19; 8,21)	9,88** (6,93; 66,14)
<i>MIR375</i>	12,14 (6,32; 17,17)	7,92 (4,91; 16,55)	10,99 (6,02; 17,06)	7,54 (4,56; 16,75)
<i>MIR1258</i>	16,01 (4,93; 30,04)	5,40 (2,78; 8,65)	3,47 (1,53; 7,86)	8,48** (3,82; 61,84)
<i>MIR339</i>	6,59 (3,29; 8,41)	8,88** (4,69; 35,27)	6,56 (4,64; 8,13)	6,97* (4,23; 33,90)
Примечание. *p<0,05 и **p<0,01 по сравнению с нормой				

Таблица 2. Сравнение уровня метилирования генов миРНК в опухолевой ткани аденокарциномы с плоскоклеточным раком легкого.

Гены миРНК	Гистологическая ткань	
	ПРЛ, N=39 Me (Q1-Q3), %	АД, N=31 Me (Q1-Q3), %
<i>MIR124-1</i>	9,82 (6.52; 37,51)	21,61 (8.18; 53.17)
<i>MIR124-2</i>	15,03* (5.54; 33.75)	6,23 (3.46; 8.87)
<i>MIR124-3</i>	15,05 (5.43; 33.77)	9,29 (3.09; 34.28)
<i>MIR125B-1</i>	22,44 (4.82; 58.33)	19.09 (6.05; 56.76)
<i>MIR127</i>	8.10 (5.62; 18.35)	7.34 (3.85; 16.55)
<i>MIR129-2</i>	7,32 (4.49; 37.88)	16.66 (5,14; 40.72)
<i>MIR137</i>	15,89 (7.58; 37.41)	9,88 (6.93; 66.14)
<i>MIR375</i>	7,92 (4.91; 16.55)	7,54 (4.26; 16.75)
<i>MIR1258</i>	16,01 (4,93; 30.04)	8,48 (3.82; 61.84)
<i>MIR339</i>	8,88 (4,69; 35.27)	6,97 (4.23; 33.90)
Примечание. *p<0,01 по сравнению с аденокарциномой		

Таблица 3. Сравнение уровня метилирования генов миРНК на ранних (I, II стадия) и поздних (III, IV) стадиях патогенеза НМРЛ.

Гены миРНК	НМРЛ	
	Стадия I, II Me (Q1-Q3), %	Стадия III, IV Me (Q1-Q3), %
<i>MIR124-1</i>	8,67 (5,54; 21,61)	46,38 (9,85; 64,45)
<i>MIR124-2</i>	6,47 (3,82; 17,32)	8,22 (6,23; 31,10)
<i>MIR124-3</i>	9,47 (5,70; 22,19)	40,37 (3,98; 58,50)
<i>MIR125B-1</i>	8,24 (3,97; 22,44)	58,77 (53,01; 69,39)
<i>MIR127</i>	6,14 (2,79; 9,29)	15,77 (7,75; 63,22)
<i>MIR129-2</i>	7,22 (4,43; 22,57)	55,57 (5,16; 75,17)
<i>MIR137</i>	9,36 (5,58; 22,35)	72,58 (7,66; 86,08)
<i>MIR375</i>	7,54 (4,28; 15,04)	8,28 (4,96; 61,10)
<i>MIR1258</i>	7,26 (3,06; 21,24)	58,08 (6,35; 70,34)
<i>MIR339</i>	6,83 (4,34; 9,42)	51,69 (6,97; 67,90)

Таблица 4. Сравнение уровня метилирования генов миРНК на III, IV стадиях при ПРЛ и АД.

Гены миРНК	ПРЛ N=39 Me (Q1-Q3), %	АД N=31 Me (Q1-Q3), %
	<i>MIR124-1</i>	43,03 (9,84; 47,77)
<i>MIR125B-1</i>	61,85 (58,09; 70,48)	58,46 (18,00; 63,34)
<i>MIR127</i>	45,51 (8,47; 65,94)	8,68 (6,95; 57,52)

Таблица 5. Связь уровня метилирования генов миРНК со степенью дифференцировки опухолевых клеток при НМРЛ.

Гены миРНК	НМРЛ	
	G ₁ /G ₂ Me (Q1-Q3), %	G ₃ Me (Q1-Q3), %
<i>MIR124-1</i>	8.85 (5.96; 22.04)	43.03** (8.59; 66.09)
<i>MIR124-2</i>	8.22 (4.45; 18.40)	7.57 (4.01; 27.08)
<i>MIR124-3</i>	9.45 (5.62; 20.71)	29.22 (3.15; 58.32)
<i>MIR125B-1</i>	15.29 (5.70; 29.14)	55.09* (5.17; 66.46)
<i>MIR127</i>	6.82 (4.07; 12.74)	8.84 (5.37; 51.05)
<i>MIR129-2</i>	8.87 (4.59; 25.20)	23.81 (4.29; 71.82)
<i>MIR137</i>	9.61 (6.68; 28.08)	35.69* (6.93; 80.63)
<i>MIR375</i>	8.40 (4.36; 16.76)	7.35 (4.83; 43.26)
<i>MIR1258</i>	8.93 (4.28; 25.59)	22.19 (3.72; 68.72)
<i>MIR339</i>	6.78 (4.31; 9.49)	25.03** (6.99; 65.86)
<i>Примечание: G₁ – высокодифференцированная опухоль; G₂ – умеренно-дифференцированная опухоль; G₃ – низкодифференцированная опухоль; *p<0,05; **p<0,01</i>		

Таблица 6. Связь уровня метилирования 10-ти генов миРНК с размером опухоли при НМРЛ.

Гены миРНК	T ₁ /T ₂ Me (Q1-Q3), %	T ₃ /T ₄ Me (Q1-Q3), %
<i>MIR124-1</i>	8,27 (4,82; 15,53)	42,89** (23,04; 62,12)
<i>MIR124-2</i>	6,24 (3,82; 15,87)	9,64** (6,47; 34,94)
<i>MIR124-3</i>	8,88 (3,20; 16,36)	38,25** (8,36; 58,13)
<i>MIR125B-1</i>	8,05 (3,97; 19,76)	58,35** (26,54; 68,25)
<i>MIR127</i>	6,82 (4,09; 9,34)	9,02* (6,17; 58,25)
<i>MIR129-2</i>	7,11 (4,02; 18,07)	55,57** (7,22; 75,17)
<i>MIR137</i>	9,37 (7,50; 24,40)	39,14* (7,37; 79,74)
<i>MIR375</i>	7,35 (4,08; 9,21)	9,07* (4,96; 61,10)
<i>MIR1258</i>	7,90 (4,12; 21,24)	34,99* (6,33; 70,34)
<i>MIR339</i>	6,78 (4,37; 8,88)	51,69** (7,54; 67,90)
<i>Примечание: *p<0,05; **p<0,01</i>		

Таблица 7. Связь уровня метилирования генов миРНК с размером опухоли при ПРЛ и АД.

Гены миРНК	ПРЛ N=39		АД N=31	
	T ₁ /T ₂ Me (Q1-Q3), %	T ₃ /T ₄ Me (Q1-Q3), %	T ₁ /T ₂ Me (Q1-Q3), %	T ₃ /T ₄ Me (Q1-Q3), %
<i>MIR124-1</i>	7,41 (5; 11,29)	42,24** (9,86; 47,41)	8,85 (5,62; 22,94)	61,23* (28,31; 74,29)
<i>MIR124-2</i>	6,32 (4,36; 8,23)	30,18** (14,85; 56,87)	5,88 (2,45; 11,9)	7,00 (4,6; 8,23)
<i>MIR124-3</i>	8,04 (5,38; 16,67)	38,25** (8,54; 58,13)	8,99 (3,08; 16,25)	42,15* (8; 53,91)
<i>MIR125B-1</i>	6,26 (3,24; 20,65)	58,32** (25,13; 69,44)	13,53 (5,7; 19,42)	58,46* (40,01; 65,55)
<i>MIR127</i>	7,57 (4,81; 9,32)	8,96 (6,85; 56,35)	6,47 (3,08; 8,87)	17,33 (4,27; 59,93)
<i>MIR129-2</i>	5,83 (3,63; 17,62)	55,57** (7,22; 68,46)	9,70 (5,14; 19,29)	50,73 (7,21; 77,13)
<i>MIR137</i>	9,14 (6,23; 21,57)	35,69* (8,08; 78,66)	9,61 (8,13; 25,84)	74,65 (6,18; 82,81)
<i>MIR375</i>	7,12 (4,36; 8,79)	9,07 (5,06; 50,4)	7,45 (4,03; 9,55)	13,58 (4,91; 61,51)
<i>MIR1258</i>	12,39 (4,50; 23,35)	27,27 (6,35; 58,4)	7,26 (3,59; 13,06)	66,50 (4,01; 77,32)
<i>MIR339</i>	6,78 (4,47; 9,28)	42,34** (9,69; 63,84)	6,78 (4,19; 7,84)	60,02* (4,25; 68,34)

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Таблица 8. Связь уровня метилирования генов миРНК с лимфогенным метастазированием при НМРЛ

Гены миРНК	N0		N1	
	Me (Q1-Q3), %		Me (Q1-Q3), %	
<i>MIR124-1</i>	8,85 (8,05; 18,57)		42,24* (9,84; 53,17)	
<i>MIR124-2</i>	9,47 (4,45; 17,91)		7,81 (5,35; 23,61)	
<i>MIR124-3</i>	16,19 (8,46; 24,30)		9,08 (4,15; 50,59)	
<i>MIR125B-1</i>	13,53 (4,82; 19,42)		58,35** (27,53; 60,77)	
<i>MIR127</i>	5,96 (2,25; 8,19)		15,77** (7,08; 54,97)	
<i>MIR129-2</i>	6,88 (3,66; 17,95)		11,87* (4,20; 63,51)	
<i>MIR137</i>	9,36 (6,68; 19,53)		28,73* (7,52; 77,51)	
<i>MIR375</i>	8,62 (8,62; 15,92)		8,28 (5,46; 22,14)	
<i>MIR1258</i>	7,97 (2,22; 17,79)		27,27** (6,46; 61,11)	
<i>MIR339</i>	6,73 (4,27; 7,23)		24,92** (6,35; 62,39)	

Примечание: *p<0,05; **p<0,01

Таблица 9. Связь уровня метилирования генов миРНК с лимфогенным метастазированием при ПРЛ и АД.

Гены миРНК	ПРЛ N=39		АД N=31	
	N0	N1	N0	N1
	Me (Q1-Q3), %	Me (Q1-Q3), %	Me (Q1-Q3), %	Me (Q1-Q3), %
<i>MIR124-1</i>	8,78 (7,71; 25,37)	9,84 (6,23; 42,99)	8,77 (8,12; 9,22)	51,62* (26,48; 69,28)
<i>MIR124-2</i>	8,88 (8,03; 24,89)	10,85 (4,97; 37,71)	6,18 (3,97; 14,27)	6,23 (1,81; 8,22)
<i>MIR124-3</i>	16,36 (8,03; 29,22)	9,00 (4,06; 41,42)	15,81 (8,90; 16,97)	8,36 (3,08; 51,68)
<i>MIR125B-1</i>	5,22 (3,97; 15,29)	41,11* (7,52; 62,03)	16,42 (6,38; 19,59)	52,56 (6,22; 58,77)
<i>MIR127</i>	6,17 (5,78; 7,98)	9,13* (5,88; 54,39)	3,50 (2,09; 9,19)	8,34* (6,47; 53,59)
<i>MIR129-2</i>	6,72 (4,43; 17,83)	17,84 (4,84; 65,87)	11,77 (3,54; 17,90)	23,23 (8,66; 61,96)
<i>MIR137</i>	19,02 (7,05; 27,43)	9,55 (7,72; 54,06)	8,74 (6,36; 9,81)	59,26* (7,37; 78,53)
<i>MIR375</i>	8,52 (4,94; 15,04)	7,12 (5,17; 25,75)	8,78 (7,47; 16,16)	6,06 (4,08; 18,53)
<i>MIR1258</i>	16,01 (1,72; 21,67)	16,60 (5,39; 50,1)	5,16 (2,77; 8,63)	36,89* (6,99; 74,57)
<i>MIR339</i>	6,92 (4,76; 7,54)	22,64* (5,44; 52,77)	5,55 (4,01; 7,01)	29,49* (6,22; 67,88)

Примечание: *p<0,05.

Таблица 10. Частота метилирования 10-ти генов миРНК при НМРЛ.

Ген миРНК (порог, %)	Опухоль	Норма	<i>P</i>
<i>MIR124-1</i> (10,65)	34/70, 48.6%	18/70, 25.7%	0,0083
<i>MIR124-2</i> (9,70)	28/70, 40.0%	11/70, 15.7%	0,0029
<i>MIR124-3</i> (12,25)	35/70, 50.0%	10/70, 14.3%	9,6x10⁻⁶
<i>MIR125B-1</i> (15,85)	38/70, 54.3%	2/70, 2.9%	2,4x10⁻¹²
<i>MIR127</i> (8,89)	28/70, 40.0%	39/70, 55.7%	0,0903
<i>MIR129-2</i> (12,19)	34/70, 48.6%	12/70, 17.1%	0,0001
<i>MIR137</i> (11,57)	35/70, 50.0%	5/70, 7.1%	1,7x10⁻⁸
<i>MIR375</i> (17,25)	17/70, 24.3%	15/70, 21.4%	0,8407
<i>MIR1258</i> (14,88)	34/70, 48.6%	3/70, 4.3%	1,3x10⁻⁹
<i>MIR339</i> (11,61)	26/70, 37.1%	7/70, 10.0%	0,0003

Примечание. Статистическая значимость (*p*) определена по тесту Фишера и подтверждена с учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественное сравнение ($FDR \leq 0.25$). МиРНК имеющие значимость $p < 10^{-5}$ помечен жирным шрифтом.

Таблица 11. Характеристики маркеров метилирования генов миРНК по диагностическому потенциалу при НМРЛ.

Гены миРНК	AUC (95% CI)	Se (%) (95% CI)	Sp (%) (95% CI)	P
<i>MIR124-1</i>	0,695 (0,607-0,782)	48,6 (44,1-53,1)	74,3 (69,8-78,8)	<10 ⁻⁴
<i>MIR124-2</i>	0,632 (0,540-0,724)	40,0 (35,3-44,7)	84,3 (79,6-89,0)	0,007
<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>MIR127</i>	0,500 (0,401-0,598)	40,0 (35,0-45,0)	44,3 (39,3-48,3)	0,997
<i>MIR129-2</i>	0,694 (0,605-0,783)	48,6 (44,1-53,0)	82,9 (78,4-87,4)	<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>MIR375</i>	0,442 (0,344-0,541)	24,3 (19,3-29,6)	77,1 (72,1-82,1)	0,238
<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: Se – чувствительность маркера; Sp – специфичность маркера; AUC –Area Under Curve (качество диагностического маркера); CI – доверительный интервал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аберрантное метилирование 21 гена микроРНК при раке молочной железы: наборы генов, связанных с показателями прогрессии, и система маркеров для прогноза лимфогенного метастазирования / В. И. Логинов, А. М. Бурденный, Е. А. Филиппова [и др.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 7. – С. 81–86.
2. Аушев, В. Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением / В. Н. Аушев // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – Т. 8, № 1. – С. 1–12.
3. Взаимосвязь маркеров апоптоза (p53, BCL-2, BAX) с клинικο-морфологическими параметрами и выживаемостью при немелкоклеточном раке легкого / Д. С. Кобяков, А. Ф. Лазарев, Е. Н. Лашникова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Т. 5. – С. 10–16.
4. Греков, И. С. Некроптоз: новая форма программируемой гибели клеток (обзор литературы) / И. С. Греков, Р. Б. Кондратюк // Медико-социальные проблемы семьи. – 2020. – Т. 25, № 3. – С. 83–89.
5. Грин, И. Р. Редактирование эпигенетических модификаций ДНК / И. Р. Грин, Д. В. Петрова, Д. О. Жарков // Гены & Клетки. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 53–60.
6. Роль микроРНК в канцерогенезе немелкоклеточного рака легкого / М. С. Губенко, В. И. Логинов, А. М. Бурденный [и др.]. // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2022. – Т. 30, № 1. – С. 123–131.
7. Гудкова, А. Я. Множественные функции опухолевого супрессора p53 // А. Я. Гудкова, О. И. Антимонова, М. М. Шавловский // Медицинский академический журнал. – 2022. – Т. 22, № 1. – С. 73–88.
8. Деев, Р. В. Современные представления о клеточной гибели / Р. В. Деев, А. И. Билялов, Т. М. Жампеисов // Гены & Клетки. – 2018. – Т. 8, № 1. – С.

9. Диагностическое значение группы генов микроРНК, гиперметилированных при немелкоклеточном раке легкого / В. И. Логинов, С. В. Рыков, Д. С. Ходырев [и др.]. // Патогенез. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 112–115.
10. Запорожченко, И. А. Основы биологии микроРНК: строение, биогенез и регуляторные функции / И. А. Запорожченко, Е. Ю. Рыкова, П. П. Лактионов // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46, № 1. – С. 3–17.
11. Идентификация новых генов микроРНК, гиперметилированных при раке молочной железы / В. И. Логинов, А. М. Бурденный, И. В. Пронина [и др.]. // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50, № 5. – С. 797–802.
12. Изменение уровня метилирования группы генов микроРНК как фактор развития и прогрессии немелкоклеточного рака лёгкого / М. С. Губенко, В. И. Логинов, А. М. Бурденный [и др.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174, № 8. – С. 222–227.
13. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – М. : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. – 252 с.
14. Клаг, У. С. Основы генетики / У. С. Клаг, М. Р. Каммингс, Ш. А. Спенсер, М. А. Палладино / пер. с англ. А. А. Лушниковой. – М. : Техносфера, 2021. – 944 с.
15. Комина, А. В. МикроРНК и малые интерферирующие РНК как инструменты направленной регуляции клеточных процессов для терапии онкологических заболеваний / А. В. Комина, С. Н. Лаврентьев, Т. Г. Рукша // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 1. – С. 160–171.
16. Метилирование генов микроРНК и онкогенез / В. И. Логинов, С. В. Рыков, М. В. Фридман [и др.]. // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 2. – С. 184–203.
17. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов апоптоза при немелкоклеточном раке легкого / М. С. Губенко, В. И. Логинов, А. М.

- Бурденный [и др.]. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2022. – Т. 66, № 4. – С. 5–12.
18. Методы ранней диагностики рака легкого (обзор литературы) / Е. О. Радионов, С. А. Тузиков, С. В. Миллер [и др.]. // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 112–122.
19. МикроРНК в онкологии: от механизмов регуляции экспрессии генов до перепрограммирования метастатической ниши / Е. В. Семина, К. Д. Рысенкова, К. Э. Трояновский [и др.]. // Биохимия. – 2021. – Т. 86, № 5. – С. 672.
20. Молекулярно-генетические изменения немелкоклеточного рака легкого / А. А. Шикеева, Т. В. Кекеева, Л. Э. Завалишина [и др.]. // Онкология. – 2013 – № 5. – С. 56–61.
21. На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки / В. Л. Шляпина, С. В. Юртаева, М. П. Рубцова, О. А. Донцова // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13, № 2. – С. 106–115.
22. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого / С. В. Рыков, Д. С. Ходырев, И. В. Пронина [и др.]. // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 7. – С. 896–901.
23. Плосконос, М. В. Экспрессия белков, контролирующих апоптоз, у больных раком предстательной железы / М. В. Плосконос, А. А. Николаев // Проблемы репродукции. – 2013. – Т. 6. – С. 14–17.
24. Пронина, И. В. Изменение уровней экспрессии генов из критичных районов хромосомы 3 человека в эпителиальных опухолях разных локализаций: дис. ... канд. биол. наук : 03.01.03 / Пронина Ирина Валерьевна ; М., 2010. – 150 с.
25. Роль метилирования генов микроРНК в патогенезе первичных опухолей почки и легкого / В. И. Логинов, С. В. Рыков, Береснева Е. В. [и др.]. // Патогенез. – 2015. – Т. 3. – С. 31–40.
26. Роль метилирования генов системы апоптоза в патогенезе рака молочной железы и яичников / Е. А. Филиппова, А. М. Бурденный, С. С. Лукина [и др.]. // Патогенез. – 2021. – Т. 19, № 3. – С. 55–61.

27. Роль экспрессии генов *c-MYC*, *BCL2* и *BCL6* в патогенезе диффузной В-крупноклеточной лимфомы // А. Е. Мисюрина, В. А. Мисюрин, Е. А. Варях [и др.]. // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 4. – С. 512–552.
28. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников / В. И. Логинов, А. В. Малюкова, Ю. А. Серегин [и др.]. // Молекулярная биология. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 654–667.
29. Савицкая, М. А. Механизмы апоптоза / М. А. Савицкая, Г. Е. Онищенко // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 11. – С. 1613–1627.
30. Связь уровня метилирования генов микроРНК с уровнем их экспрессии и с патоморфологическими характеристиками рака молочной железы / Е. А. Филиппова, И. В. Пронина, С. С. Лукина [и др.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171, № 6. – С. 756–761.
31. Системы маркеров на основе метилирования генов микроРНК в диагностике рака молочной железы на I-II стадиях / Э. А. Брага, Е. А. Филиппова, В. И. Логинов [и др.]. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 8. – С. 238–242.
32. Снеговой, А. В. Значение биомаркеров для определения тактики лечения и прогноза злокачественных опухолей / А. В. Снеговой, Л. В. Манзюк // Практическая онкология. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 166–170.
33. Таргетирование белков семейства *Bcl-2*: что, где, когда? / В. В. Сеничкин, Н. В. Первушин, А. П. Зуев [и др.]. // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1421–1441.
34. Тармаев, А. А. МикроРНК как перспективные биомаркеры при раке / А. А. Тармаев, О. А. Бейлерли // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2019. – Т. 11, № 3. – С. 5–12.
35. Филиппова, Е. А. Аномальная экспрессия и aberrантное метилирование генов и микроРНК, связанных с апоптозом, в патогенезе рака молочной

- железы и яичников: дис. ... канд. мед. наук : 14.03.03 / Филиппова Елена Александровна. – М., 2020. – 134 с.
36. Патент № 2507268 Российская Федерация, МПК C12N 15/11, МПК C12Q 1/68. Система маркеров на основе группы генов микроРНК для диагностики немелкоклеточного рака легкого, включая плоскоклеточный рак и аденокарциному : № 2012142228/10 : заявл. 04.10.2012 : опубл. 20.02.2014 / Брага Э. А., Казубская Т. П., Логинов В. И. [и др.]. – 7 с. : ил. – Текст : непосредственный.
37. Чикунов, И. Е. Роль метилирования ДНК в регуляции дифференциальной экспрессии микроРНК в канцерогенезе / И. Е. Чикунов, А. В. Набока // Наука юга России. – 2016. – Т. 12, № 4. – С. 50–56.
38. Aberrant Methylation of 20 miRNA Genes Specifically Involved in Various Steps of Ovarian Carcinoma Spread: From Primary Tumors to Peritoneal Macroscopic Metastases / V. I. Loginov, I. V. Pronina, E. A. Filippova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23 (3). – P. 1300.
39. Aberrant microRNA-137 promoter methylation is associated with lymph node metastasis and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer / L. Min, F. Wang, S. Hu [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 15 (5). – P. 7744–7750.
40. Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer / Y. Zhao, H. Zhou, K. Ma [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2013. – Vol. 5 (4). – P. 1211–1218.
41. Alu hypomethylation in smoke-exposed epithelia and oral squamous carcinoma / C. Puttipanyalears, K. Subbalekha, A. Mutirangura, N. Kitkumthorn // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2013. – Vol. 14. – P. 5495–5501.
42. Autocrine human growth hormone increases sensitivity of mammary carcinoma cell to arsenic trioxide-induced apoptosis / A. Zekri, S. H. Ghaffari, M. Yousefi [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2013. – Vol. 377 (1–2). – P. 84–92.

43. Axl-Targeted Delivery of the Oncosuppressor miR-137 in Non-small-Cell Lung Cancer / S. Nuzzo, S. Catuogno M. Capuozzo [et al.] // *Mol. Ther Nucleic. Acids.* – 2019. – Vol. 17256. – P. 263.
44. Azizi, M. The Role of MicroRNAs in Lung Cancer Metabolism // M. Azizi, I. Othman, R. Naidu // *Cancers (Basel).* – 2021. – Vol. 13 (7). – P. 1716.
45. Banzhaf-Strathmann, J. Good guy or bad guy: The opposing roles of microRNA 125b in cancer / J. Banzhaf-Strathmann, D. Edbauer // *Cell. Commun. Signal.* – 2014. – Vol. 12. – P. 30.
46. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions / D. P. Bartel // *Cell.* – 2009. – Vol. 136. – P. 215–233.
47. Bialik, S. The death-associated protein kinases: Structure, function, and beyond / S. Bialik, A. Kimchi // *Annu Rev. Biochem.* – 2006. – T. 75. – P. 189–210.
48. Bin, C. The effect of microRNA-129 on the migration and invasion in NSCLC cells and its mechanism / C. Bin, H. Xiaofeng, X. Wanzi // *Exp. Lung. Res.* – 2018. – Vol. 44, № 6. – P. 280–287.
49. Characterizing methylation regulated miRNA in carcinoma of the human uterine cervix / V. K. Varghese, V. Shukla, P. V. Jishnu [et al.] // *Life Sci.* – 2019. – Vol. 232. – P. 116668.
50. Chen, H. Hypermethylation-Associated Silencing of miR-125a and miR-125b: A Potential Marker in Colorectal Cancer / H. Chen, Z. Xu // *Dis. Markers.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 345–380.
51. Chen, H. Y. The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis / H. Y. Chen, Y. R. Lee, R. H. Chen // *Apoptosis.* – 2014. – Vol. 19, № 2. – P. 364–370.
52. Circular RNA circ-PVT1 contributes to paclitaxel resistance of gastric cancer cells through the regulation of ZEB1 expression by sponging miR-124-3p / Y. Y. Liu, L. Y. Zhang, W. Z. Du // *Bioscience Reports.* – 2019. – Vol. 39, № 12. – P. 00–00.
53. Clinical significance of DAPK promoter hypermethylation in lung cancer: a meta-analysis / Y. Li, M. Zhu, X. Zhang [et al.] // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2015. – Vol. 9. – P. 785–796.

54. Clinical Value and Prospective Pathway Signaling of MicroRNA-375 in Lung Adenocarcinoma: A Study Based on the Cancer Genome Atlas (TCGA), Gene Expression Omnibus (GEO) and Bioinformatics Analysis / T. Q. Gan, W.-J. Chen, H. Qin [et al.] // *Med. Sci. Monit.* – 2017. – Vol. 23. – P. 2453–2464.
55. Clinicopathological significance of DAPK gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer: A meta-analysis / Z. Chen, Y. Fan, X. Liu [et al.] // *Int. J. Biol. Markers.* – 2022. – Vol. 37 (1). – P. 47–57.
56. Clinicopathological significance of DAPK promoter methylation in non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis / Y. Zhang, J. Wu, G. Huang, S. Xu // *Cancer Manag. Res.* – 2018. – Vol. 10. – P. 6897–6904.
57. Combined Effect of Metastasis-Related MicroRNA, miR-34 and miR-124 Family, Methylation on Prognosis of Non-Small-Cell Lung Cancer / Y. H. Kim, W. L. Lee, E. B. Lee [et al.] // *Clin. Lung. Cancer.* – 2017. – Vol. 18 (1). – P. e13–e20.
58. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1 / J. P. Thomson, P. Skene, J. Jim Selfridge [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 464 (7291). – P. 45–49.
59. Crosstalk between Methylation and ncRNAs in Breast Cancer: Therapeutic and Diagnostic Implications / Y. Liu, P. Leng, J. Guo [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23 (24). – P. 157–159.
60. DAPK promoter methylation status correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer / J. Zhang, X. L. Yu, G.-F. Zheng, F. Zhao // *Cancer Biomark.* – 2015. – Vol. 15 (5). – P. 60917.
61. Death-associated protein kinase promoter methylation correlates with clinicopathological and prognostic features in nonsmall cell lung cancer patients: A cohort study / X.-Y. Yang, J. Zhang, X.-L. Yu [et al.] // *J. Cancer Res. Ther.* – 2018. – Vol. 14 (Supplement). – P. 65–71.
62. Decreased miR-124-3p promoted breast cancer proliferation and metastasis by targeting MGAT5 / G. Yan, Y. Li, L. Zhan [et al.] // *Am. J. Cancer. Res.* – 2019. – Vol. 9 (3). – P. 585–596.

63. Distinct methylation patterns of benign and malignant liver tumors revealed by quantitative methylation profiling / U. Lehmann, I. Berg-Ribbe, L. U. Wingen [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 3654–3660.
64. DNA methylation and microRNA dysregulation in cancer / H. Suzuki, R. Maruyama, E. Yamamoto, M. Kai // *Mol. Oncol.* – 2012. – Vol. 6 (6). – P. 567–578.
65. DNA Methylation and Non-Coding RNAs during Tissue-Injury Associated Pain / J. Irfan, M. R. Febrianto, A. Sharma [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23 (2) – P. 752.
66. DNA methylation as mechanism of apoptotic resistance development in endometrial cancer patients / V. Fialkova, E. Vidomanova, T. Balharek [et al.] // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2017. – Vol. 36 (5). – P. 521–529.
67. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression / I. V. Pronina, V. I. Loginov, A. M. Burdenny [et al.] // *Gene.* – 2017. – Vol. 604. – P. 1–8.
68. Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-FU in colorectal cancer / M. Manoochchri, A. Karbasi, M. Bandehpour, B. Kazemi // *Pathol. Oncol. Res.* – 2014. – Vol. 20. – P. 301–307.
69. Dual-targeting of miR-124-3p and ABCC4 Promotes Sensitivity to Adriamycin in Breast Cancer Cells / D. Hu, M. Li, J. Su [et al.] // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* – 2019. – Vol. 23 (3). – P. 156–165.
70. Duruisseaux, M. Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications / M. Duruisseaux, M. Esteller // *Semin. Cancer Biol.* – 2018. – Vol. 51. – P. 116–128.
71. Epigenetic analysis of microRNA genes in tumors from surgically resected lung cancer patients and association with survival / W. Tan, J. Gu, M. Huang [et al.] // *Mol. Carcinog.* – 2015. – Vol. 54 (Suppl 1). – P. 45–51.
72. Epigenetic downregulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia / E. San José-Eneriz, X. Agirre, A. Jiménez-Velasco [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 45. – P. 1877–1889.

73. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature / T. Kunej, I. Godnic, J. Ferdin [et al.] // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 717. – P. 77–84.
74. Epigenetic regulation of miR-129-2 and its effects on the proliferation and invasion in lung cancer cells / H. Wang, R. Wen, J. He [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2015. – Vol. 19. – P. 2172–2180.
75. Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy / A. Mehta, S. Dobersch, A. J. Romero-Olmedo, G. Barreto // *Cancer Metastasis Rev.* – 2015. – Vol. 34 (2). – P. 229–241.
76. Eskelinen, E. L. Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating / E. L. Eskelinen // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2019. – Vol. 111. – P. 1–10.
77. Evaluation of microRNA 92a Expression and Its Target Protein Bim in Colorectal Cancer / A. Zaki, A. Fawzy, S. Y. Akel [et al.] // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2022. – Vol. 23 (2). – P. 723–730.
78. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers / I. V. Pronina, V. I. Loginov, A. M. Burdenny [et al.] // *Gene.* – 2016. – Vol. 576, № 1 (3). – P. 483–491.
79. Expression of miRNAs in non-small-cell lung carcinomas and their association with clinicopathological features / E. Tafsiri, M. Darbouy, M. B. Shadmehr [et al.] // *Tumour. Biol.* – 2015. – Vol. 36 (3). – P. 1603–1612.
80. Frequent DNA methylation changes in cancerous and noncancerous lung tissues from smokers with non-small cell lung cancer / K. Daniunaite, A. Sestokaite, R. Kubiliute [et al.] // *Mutagenesis.* – 2020. – Vol. 10. – P. 00.
81. Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PD-L1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification / L. Q. Wang, S. Kumar, G. A. Calin [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2020. – Vol. 190. – P. 249–261.
82. Frisbie, L. Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Architects of the Pro-tumorigenic Tumor Microenvironment / L. Frisbie, R.

- J. Buckanovich, L. Coffman // *Stem. Cells.* – 2022. – Vol. 40 (8). – P. 705–715.
83. Gene body methylation in cancer: molecular mechanisms and clinical applications / Q. Wang, F. Xiong, G. Wu [et al.] // *Clin. Epigenetics.* – 2022. – Vol. 14 (1). – P. 154.
84. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review / K. Wadowska, I. Bil-Lula, Ł. Trembecki, M. Śliwińska-Mossoń // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (13). – P. 4569.
85. Genome-Wide Expression of MicroRNAs Is Regulated by DNA Methylation in Hepatocarcinogenesis / J. Shen, S. Wang, A. B. Siegel [et al.] // *Gastroenterol. Res. Pract.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 230642.
86. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact / D. Monk, D. G. Mackay, T. Eggermann [et al.] // *Nat. Rev. Genet.* – 2019. – Vol. 20 (4). – P. 235–248.
87. Ginder, G. D. Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets / G. D. Ginder, D. C. Jr. Williams // *Pharmacol. Ther.* – 2018. – Vol. 184. – P. 184–198.
88. Global Cancer Observatory: Cancer Today / J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam [et al.]. – Lyon, France : International Agency for Research on Cancer, 2020. – URL: <https://gco.iarc.fr/today> (дата обращения: 28.03.2023).
89. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J. Clin.* – 2021. – Vol. 71 (3). – P. 209–249.
90. Gujar, H. The Roles of Human DNA Methyltransferases and Their Isoforms in Shaping the Epigenome / H. Gujar, D. J. Weisenberger, G. Liang // *Genes (Basel).* – 2008. – Vol. 10 (2). – P. 172.
91. Hanahan, D. Rethinking the war on cancer / D. Hanahan // *Lancet.* – 2014. – Vol. 383 (9916). – P. 558–563.
92. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: New Dimensions / D. Hanahan // *Cell.* – 2022. – Vol. 00. – P. 31–46.

93. Hata, A. N. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics / A. N. Hata, J. A. Engelman, A. C. Faber // *Cancer Discov.* – 2015. – Vol. 5. – P. 475–487.
94. Heller, G. DNA methylation of microRNA-coding genes in non-small-cell lung cancer patients / G. Heller, C. Altenberger // *J. Pathol.* – 2018. – Vol. 245 (4). – P. 387–398.
95. Hervouet, E. Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme / E. Hervouet, F. Vallette, P. Cartron // *Cell. Death Dis.* – 2010. – Vol. 1. – P. e8.
96. Histone deacetylation, as opposed to promoter methylation, results in epigenetic BIM silencing and resistance to EGFR TKI in NSCLC / M. Zhao, Y. Zhang, J. Li [et al.] // *Oncol Lett.* – 2018. – Vol. 15. – Pp. 1089–1096.
97. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death / L. P. Deiss, E. Feinstein, H. Berissi [et al.] // *Genes. Dev.* – 1995. – Vol. 9. – P. 15–30.
98. Inhibition of LHX2 by miR-124 suppresses cellular migration and invasion in non-small cell lung cancer / Q. Yang, L. Wan, C. Xiao [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2017. – Vol. 14 (3). – P. 3429–3436.
99. Integrative microRNA and gene profiling data analysis reveals novel biomarkers and mechanisms for lung cancer // L. Hu, J. Ai, H. Long [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7 (8). – P. 8441–8454.
100. Investigation the Role of Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer / M. Pargol, M. Akbari, S. Zare Karizi [et al.] // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2021. – Vol. 22 (3). – P. 947–955.
101. Kanwal, R. Cancer epigenetics: an introduction / R. Kanwal, Gupta K., Gupta S. // *Methods. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 1238. – P. 3–25.
102. Lack of association between deletion polymorphism of BIM gene and in vitro drug sensitivity in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia / M. Huang, K. Miyake, K. Kagami [et al.] // *Leuk. Res.* – 2017. – Vol. 60. – P. 24–30.

103. Langevin, S. M. Epigenetics of lung cancer / S. M. Langevin, R. A. Kratzke, K. T. Kelsey // *Transl. Res.* – 2015. – Vol. 165 (1). – P. 74–90.
104. LINC00961 functions as an anti-oncogene in non-small cell lung carcinoma by regulation of miR-3127 / Y. G. Liu, J. Li, F. Nie, G. W. Jin // *Am. J. Transl. Res.* – 2022. – Vol. 14. – P. 888–898.
105. LncRNA MIR22HG negatively regulates miR-141-3p to enhance DAPK1 expression and inhibits endometrial carcinoma cells proliferation / Z. Cui, X. An, J. Li [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – Vol. 104. – P. 223–228.
106. LncRNA T-UCR Uc.339/miR-339/SLC7A11 Axis Regulates the Metastasis of Ferroptosis-Induced Lung Adenocarcinoma / N. Zhang, J. Huang, M. Xu, Y. Wang // *J. Cancer.* – 2022. – Vol. 13. – P. 1945–1957.
107. Low expression of Bax predicts poor prognosis in resected non-small cell lung cancer patients with non-squamous histology / S. H. Jeong, H. W. Lee, J. H. Han [et al.] // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 38. – P. 661–669.
108. LOX-1 and cancer: an indissoluble liaison / M. Murdocca, C. De Masi, S. Pucci [et al.] // *Cancer Gene Ther.* – 2021. – Vol. 28 (10–11). – P. 1088–1098.
109. Lung cancer-associated mesenchymal stem cells promote tumor metastasis and tumorigenesis by induction of epithelial-mesenchymal transition and stem-like reprogram / C. Yan, J. Chang, X. Song [et al.] // *Aging (Albany NY)*. – 2021. – Vol. 13 (7). – P. 9780–9800.
110. Lung cancer cytology and small biopsy specimens: diagnosis, predictive biomarker testing, acquisition, triage, and management / S. Sung, J. J. Heymann, J. P. Crapanzano [et al.] // *J. Am. Soc. Cytopathol.* – 2020. – Vol. 9 (5). – P. 332–345.
111. Majed, S. O. RNA Sequencing-Based Total RNA Profiling; The Oncogenic MiR-191 Identification as a Novel Biomarker for Breast Cancer / S. O. Majed // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. – 2022. – Vol. 68. – P. 177–191.

112. Major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25 / J. E. Bailey-Wilson, C. I. Amos, S. M. Pinney [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2004. – Vol. 75 (3). – P. 460–474.
113. Measurement of BH3-only protein tolerance / H. Dai, H. Ding, K. L. Peterson [et al.] // *Cell. Death. Differ.* – 2018. – Vol. 25. – P. 282–293.
114. Mechanism of MicroRNA-375 Promoter Methylation in Promoting Ovarian Cancer Cell Malignancy / J. Shu, L. Xiao, S. Yan [et al.] // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2021. – Vol. 20. – P. 00–00.
115. Menju, T. Lung cancer and epithelial-mesenchymal transition / T. Menju, H. Date // *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2021. – Vol. 69 (5). – P. 781–789.
116. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / D. Planchard, S. Popat, K. Kerr [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2018. – Vol. 29 (Suppl 5). – P. 192–237.
117. Methylation analysis for multiple gene promoters in non-small cell lung cancers in high indoor air pollution region in China // X. Huang, C. Wu, Y. Fu [et al.] // *Bull Cancer.* – 2018. – Vol. 105 (9). – P. 746–754.
118. Methylation markers of early-stage non-small cell lung cancer / K. Lokk, T. Vooder, R. Kolde [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – P. e39813.
119. Methylation-mediated repression of microRNA 129-2 enhances oncogenic SOX4 expression in HCC / X. Chen, L. Zhang, T. Zhang [et al.] // *Liver. Int.* – 2013. – Vol. 33. – P. 476–486.
120. Michlewski, G. Post-transcriptional Control of miRNA biogenesis / G. Michlewski, J. F. Caceres // *Biogenesis. Rna.* – 2019. – Vol. 25, № 1. – P. 1–16.
121. MicroRNA-124 suppresses proliferation and glycolysis in non-small cell lung cancer cells by targeting AKT-GLUT1/HKII / X. Zhao, C. Lu, W. Chu, [et al.] // *Tumour. Biol.* – 2017. – Vol. 39 (5). – P. 1010428317706215.
122. MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R / J. Gong, J. P. Zhang, B. Li [et al.] // *Oncogene.* – 2013. – Vol. 32. – P. 3071–3079.

123. MicroRNA-1258 Inhibits the Proliferation and Migration of Human Colorectal Cancer Cells through Suppressing CKS1B Expression / J. S. Hwang, E. J. Jeong, J. Choi [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2019. – Vol. 10. – P. 912.
124. MicroRNA-1258 suppresses tumour progression via GRB2/Ras/Erk pathway in non-small-cell lung cancer / W. Jiang, K. Wei, C. Pan [et al.] // *Cell Prolif.* – 2018. – Vol. 51. – P. e12502.
125. MicroRNA-137 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting SLC22A18 / B. Zhang, T. Liu, T. Wu [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 74. – P. 111–118.
126. MicroRNA-148a is a prognostic oncomiR that targets MIG6 and BIM to regulate EGFR and apoptosis in glioblastoma / J. Kim, Y. Zhang, M. Skalski [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74. – P. 1541–1553.
127. MicroRNA-339, an epigenetic modulating target is involved in human gastric carcinogenesis through targeting NOVA1 / B. Shen, Y. Zhang, S. Yu [et al.] // *FEBS Lett.* – 2015. – Vol. 589 (20 PtB). – P. 3205–3211.
128. MicroRNA-339 inhibits human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion via targeting ZNF689 / H. Zeng, J. Zheng, S. Wen [et al.] // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2019. – Vol. 13. – P. 435–445.
129. MicroRNA-375 regulates proliferation and migration of colon cancer cells by suppressing the CTGF-EGFR signaling pathway / K. J. Alam, J.-S. Mo, S.-H. Han, W.-C. Park // *Int. J. Cancer.* – 2017. – Vol. 141 (8). – P. 1614–1629.
130. MiRNA-125b regulates apoptosis of human non-small cell lung cancer via the PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway / Y. Wang, M. Zhao, J. Liu [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2017. – Vol. 38 (3). – P. 1715–1723.
131. MiRNA-375 regulates the cell survival and apoptosis of human non-small cell carcinoma by targeting HER2 / L. Cheng, Zhan B., Luo P. [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2017. – Vol. 15 (3). – P. 1387–1392.
132. MiR-1 Targeted Downregulation of Bcl-2 Increases Chemosensitivity of Lung Cancer Cells / C. Chen, Y. Zhou, P. Ding, L. He // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* – 2021. – Vol. 25, № 8. – P. 540–545.

133. MiR-103/107 promotes metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4 / H. Y. Chen, Y. M. Lin, H. C. Chung [et al.] // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72 (14). – P. 3631–3641.
134. MiR-124 changes the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin through targeting STAT3 / M. M. Qi, F. Ge, X. J. Chen [et al.] // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2019. – Vol. 23 (12). – P. 5242–5250.
135. MiR-124 Inhibits Growth and Enhances Radiation-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer by Inhibiting STAT3 / M. Wang, B. Meng, Y. Liu [et al.] // *Cell. Physiol. Biochem.* – 2017. – Vol. 44 (5). – P. 2017–2028.
136. MiR-127 promotes EMT and stem-like traits in lung cancer through a feed-forward regulatory loop / L. Shi, Y. Wang, Z. Lu [et al.] // *Oncogene.* – 2017. – Vol. 36 (12). – P. 1631–1643.
137. MiR-127 regulates cell proliferation and senescence by targeting BCL6 / J. Chen, M. Wang, M. Guo [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 8 (11). – P. e80266.
138. MiR-1258 promotes the apoptosis of cervical cancer cells by regulating the E2F1/P53 signaling pathway / X. Peng, Y. Zhang, J. Gao, C. Cai // *Experimental and Molecular Pathology.* – 2020. – Vol. 114. – P. 104368.
139. MiR-129-2 upregulation induces apoptosis and promotes NSCLC chemosensitivity by targeting SOX4 / W. Zhou, C. Cai, J. Lu, Q. Fan // *Thorac. Cancer.* – 2022. – Vol. 13 (7). – P. 956–964.
140. MiR-129-5p sensitization of lung cancer cells to etoposide-induced apoptosis by reducing YWHAB / C. Xu, Z. Du, S. Ren [et al.] // *J. Cancer.* – 2020. – Vol. 11 (4). – P. 858–866.
141. MiR-137 impairs the proliferative and migratory capacity of human non-small cell lung cancer cells by targeting paxillin / Y. Bi, Y. Han, H. Bi [et al.] // *Hum. Cell.* – 2014. – Vol. 27 (3). – P. 95–102.
142. MiR-137 inhibits the proliferation of lung cancer cells by targeting Cdc42 and Cdk6 / X. Zhu, Y. Li, H. Shen [et al.] // *FEBS Lett.* – 2013. – Vol. 587 (1). – P. 73–81.

143. MiR-137 is a tumor suppressor in endometrial cancer and is repressed by DNA hypermethylation / W. Zhang, J.-H. Chen, T. Shan [et al.] // *Lab. Invest.* – 2018. – Vol. 98 (11). – P. 1397–1407.
144. MIR137/MIR2682 locus is associated with perineural invasiveness in head and neck cancer / H. Čelešnik, T. Büdefeld, B. Čizmarević [et al.] // *J. Oral. Pathol. Med.* – 2021. – Vol. 50 (9). – P. 874–881.
145. MiR-193b promoter methylation accurately detects prostate cancer in urine sediments and miR-34b/c or miR-129-2 promoter methylation define subsets of clinically aggressive tumors / J. Torres-Ferreira, J. Ramalho-Carvalho, A. Gomez [et al.] // *Mol. Cancer.* – 2017. – Vol. 16. – P. 26.
146. MiR-199a: A Tumor Suppressor with Noncoding RNA Network and Therapeutic Candidate in Lung Cancer / W. Meng, Y. Li, B. Chai [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23 (15). – P. 8518.
147. MiR-339-5p inhibits lung adenocarcinoma invasion and migration by directly targeting BCL6 / P. Li, H. Liu, Y. Li [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 16. – P. 5785–5790.
148. MiR-339-5p inhibits metastasis of non-small cell lung cancer by regulating the epithelial-to-mesenchymal transition / X. Zhang, Z. Yang, Y. Li [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 15. – P. 2508–2514.
149. MiR-379-5p inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in non-small cell lung cancer by targeting β -arrestin-1 / Y. Jiang, P. Zhu, Y. Gao, A. Wang // *Mol. Med. Rep.* – 2020. – Vol. 22. – P. 4499–4508.
150. MiR-484 promotes non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression through inhibiting Apaf-1 associated with the suppression of apoptosis / T. Li, Z. L. Ding, Y. L. Zheng, W. Wang // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – Vol. 96. – P. 153–164.
151. MiR-7 methylation as a biomarker to predict poor survival in earlystage non-small cell lung cancer patients / C. Rodríguez-Antolín, L. Felguera-Selas, O. Pernía [et al.] // *Cell. Biosci.* – 2019. – Vol. 9. – P. 63.
152. Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis / V. Mittal // *Annu Rev. Pathol.* – 2018. – Vol. 13. – P. 395–412.

153. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson [et al.] // *Cell. Death And Differentiation*. – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486–541.
154. Morris, L. G. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes / L. G. Morris, T. A. Chan // *Cancer*. – 2015. – Vol. 121, № 9. – P. 1357–1368.
155. Nistico, P. Biological mechanisms linked to inflammation in cancer: Discovery of tumor microenvironment-related biomarkers and their clinical application in solid tumors / P. Nistico, G. Ciliberto // *Int. J. Biol. Markers*. – 2020. – Vol. 35 (1_suppl). – P. 8–11.
156. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis / V. I. Loginov, I. V. Pronina, A. M. Burdenny [et al.] // *Gene*. – 2018. – Vol. 662. – P. 28–36.
157. Omics for prediction of environmental health effects: Blood leukocyte-based cross-omic profiling reliably predicts diseases associated with tobacco smoking / P. Georgiadis, D. Hebels, I. Valavanis [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. e20544.
158. Ozyerli-Goknar, E. Epigenetic Deregulation of Apoptosis in Cancers / E. Ozyerli-Goknar, T. Bagci-Onder // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13. – P. 3210.
159. Pappalardo, X. G. Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad / X. G. Pappalardo, V. Barra // *Epigenetics Chromatin*. – 2021. – Vol. 14 (1). – P. 25.
160. Parry, L. The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer / L. Parry, A. R. Clarke // *Genes. Cancer*. – 2011. – Vol. 2 (6). – P. 618–630.
161. Peng, B. Essential functions of miR-125b in cancer / B. Peng, P. Y. Theng, M. T. N. Le // *Cell. Prolif.* – 2021. – Vol. 54 (2). – P. e12913.
162. Perlikos, F. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review / F. Perlikos, K. J. Harrington, K. N. Syrigos // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2013. – Vol. 87 (1). – P. 1–11.

163. Pfeifer, G. P. Methylation of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Human Tumors / G. P. Pfeifer, R. Dammann // *Biochemistry (Mosc.)*. – 2018. – Vol. 70. – P. 576–583.
164. Piletič, K. MicroRNA epigenetic signatures in human disease / K. Piletič, T. Kunej // *Arch. Toxicol.* – 2016. – Vol. 90, № 10. – P. 2405–2419.
165. Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review / J. Zhang, S. Wang, L. Wang [et al.] // *Oncol. Targets. Ther.* – 2015. – Vol. 8. – P. 3361–3369.
166. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the BCL2-associated X gene in nasopharyngeal carcinoma: a retrospective cohort study / C. K. Kontos, A. Fendri, A. Khabir, [et al.] // *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – P. 293.
167. Reactivation of tumour suppressor in breast cancer by enhancer switching through NamiRNA network / Y. Liang, Q. Lu, W. Li [et al.] // *Nucleic. Acids. Res.* – 2021. – Vol. 49. – P. 8556–8572.
168. Reddy, K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer / K. B. Reddy // *Cancer Cell. Int.* – 2015. – Vol. 15. – P. 38.
169. Regulation of the Key Epithelial Cancer Suppressor miR-124 Function by Competing Endogenous RNAs / E. A. Braga, M. V. Fridman, A. M. Burdenny [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23 (21). – P. 13620.
170. Ren, H. MiR-339 depresses cell proliferation via directly targeting S-phase kinase-associated protein 2 mRNA in lung cancer / H. Ren, Y. Zhang, H. Zhu // *Thorac. Cancer*. – 2018. – Vol. 9. – P. 408–414.
171. Peripheral blood miR-328 expression as a potential biomarker for the early diagnosis of NSCLC / P. Ulivi, G. Foschi, M. Mengozzi [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 10332–10342.
172. Research progress on microRNA-1258 in the development of human cancer / M. Qian, Y. Xia, G. Zhang [et al.] // *Front Oncol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 1024234.
173. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma / J. A. Richter-Larrea, E. F. Robles, V. Fresquet [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – P. 2531–2542.

174. Review of Molecular Interplay between Neurotrophins and miRNAs in Neuropsychological Disorders / S. A. Abdolahi, A. Zare-Chahoki, F. Noorbakhsh, A. Gorji // *Mol. Neurobiol.* – 2022. – Vol. 59 (10). – P. 6260–6280.
175. Role of MicroRNA-124 as a Prognostic Factor in Multiple Neoplasms: A Meta-Analysis / Z. Zhou, J. Lv, J. Wang [et al.] // *Dis. Markers.* – 2019. – P. 1654780.
176. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook. – Cold Spring Harbor N. Y. : Cold Spring Harbor Press, 1989. – 479 p.
177. Shakeri, R. Regulation and function in cell death / R. Shakeri, A. Kheirollahi, J. Davoodi // *Biochimie.* – 2017. – Vol. 135. – P. 111–125.
178. Shakeri, R. Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases / R. Shakeri, A. Kheirollahi, J. Davoodi // *Biochimie.* – 2021. – Vol. 190. – P. 91–110.
179. Silencing of miR-137 by aberrant promoter hypermethylation in surgically resected lung cancer / N. Kang, S. Y. Choi, Y. K. Kim [et al.] // *Lung Cancer.* – 2015. – Vol. 89 (2). – P. 99–103.
180. Silveira, D. A. Systems biology approach suggests new miRNAs as phenotypic stability factors in the epithelial-mesenchymal transition / D. A. Silveira, S. Gupta, J. M. Mombach // *JR Soc. Interface.* – 2020. – Vol. 17 (171). – P. 20200693.
181. Simo-Riudalbas, L. Cancer genomics identifies disrupted epigenetic genes / L. Simo-Riudalbas, M. Esteller // *Hum. Genet.* – 2014. – Vol. 133 (6). – P. 713–725.
182. Simultaneous expression of cancer stem cell-like properties and cancer-associated fibroblast-like properties in a primary culture of breast cancer cells / M. Ishikawa, T. Inoue, T. Shirai [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2014. – Vol. 6. – P. 1570–1578.
183. Singh, P. Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy / P. Singh, P. Ravanan, P. Talwar // *Front. Mol. Neurosci.* – 2016. – Vol. 9. – P. 46.

184. Sionov, R. V. Regulation of Bim in Health and Disease / R. V. Sionov, S. A. Vlahopoulos, Z. Granot // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – P. 23058–23134.
185. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution / E. C. De Bruin, N. McGranahan, R. Mitter [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 346 (6206). – P. 251.
186. Sun, Y. The emerging molecular machinery and therapeutic targets of metastasis / Y. Sun, L. Ma // *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 36 (6). – P. 349–359.
187. System of Markers Based on the Methylation of a Group of Proapoptotic Genes in Combination with MicroRNA in the Diagnosis of Breast Cancer / E. A. Braga, A. M. Burdenny, I. V. Pronina [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2020. – Vol. 168 (3). – P. 366–370.
188. Szymczyk, A. Abnormal microRNA expression in the course of hematological malignancies / A. Szymczyk, A. Macheta, M. Podhorecka // *Cancer Manag. Res.* – 2018. – Vol. 10. – P. 4267–4277.
189. TGF β -induced transcription in cancer / G. Cantelli, E. Crosas-Molist, M. Georgouli [et al.] // *Semin. Cancer Biol.* – 2017. – Vol. 42. – P. 60–69.
190. The comprehensive and scope of miR-34a in cancer research / S. Li, X. Wei, J. He. [et al.] // *Cancer Metastasis. Rev.* – 2021. – Vol. 40 (3). – P. 925–948.
191. The Differential DNA Hypermethylation Patterns of microRNA-137 and microRNA-342 Locus in Early Colorectal Lesions and Tumours / E. Kashani, M. Hadizadeh, V. Chaleshi [et al.] // *Biomolecules*. – 2019. – Vol. 9 (10). – P. 519.
192. The expression of heparanase and microRNA-1258 in human non-small cell lung cancer / H. Liu, Chen X., Gao W., Jiang G. // *Tumour. Biol.* – 2012. – Vol. 33 (5). – P. 1327–1334.
193. The genomic landscape of retinoblastoma: a review / B. L. Thériault, H. Dimaras, B. L. Gallie, T. W. Corson // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 42 (1). – P. 33–52.

194. The potential role of miR-29 in health and cancer diagnosis, prognosis, and therapy / M. Alizadeh, A. Safarzadeh, F. Beyranvand [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2019. – Vol. 234 (11). – P. 19280–19297.
195. The prognostic significance of DAPK1 in bladder cancer / J. Y. Xie, P. C. Chen, J. L. Zhang [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12. – P. e0175290.
196. The Tumor Suppressor DAPK Inhibits Cell Motility by Blocking the Integrin-Mediated Polarity Pathway // J. C. Kuo, W. J. Wang, C. C. Yao [et al.] // *J. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 172 (4). – P. 619–631.
197. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts in Cancer Invasion and Metastasis / P. J. Asif, C. Longobardi, M. Hahne [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2021. – Vol. 13 (18). – P. 354.
198. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers: influence on cancer progression and angiogenesis / V. I. Loginov, A. A. Dmitriev, V. N. Senchenko [et al.] // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10 (5). – P. 00–00.
199. Types in Environmental Epigenetic Studies: Biological and Epidemiological Frameworks / K. A. Campbell, J. A. Colacino, S. K. Park [et al.] // *Cell. Curr. Environ. Health Rep.* – 2020. – Vol. 7 (3). – P. 185–197.
200. Upregulated miR-1258 regulates cell cycle and inhibits cell proliferation by directly targeting E2F8 in CRC / Z. Zhang, J. Li, Y. Huang [et al.] // *Cell. Prolif.* – 2018. – Vol. 51. – P. e12505.
201. Utility of Serum miR-125b as a Diagnostic and Prognostic Indicator and Its Alliance with a Panel of Tumor Suppressor Genes in Epithelial / M. Zuberi, I. Khan, R. Mir [et al.] // *Ovarian Cancer.* – 2016. – Vol. 11 (4). – P. 153902.
202. Viallard, C. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets / C. Viallard, B. Larrivé // *Angiogenesis.* – 2017. – Vol. 20 (4). – P. 409–426.
203. Wang, L. MiR-127 suppresses gastric cancer cell migration and invasion via targeting Wnt7a / L. Wang, X. Wang, X. Jiang // *Oncol. Lett.* – 2019. – Vol. 17 (3). – P. 3219–3226.

204. Weisenberger, D. J. The Role of DNA Methylation and DNA Methyltransferases in Cancer / D. J. Weisenberger, R. Lakshminarasimhan, G. Liang // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2022. – Vol. 1389. – P. 317–348.
205. Willis, S. N. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis / S. N. Willis, J. M. Adams // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 17. – P. 617–625.
206. Yang, S. Epigenetic Alterations and Inflammation as Emerging Use for the Advancement of Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer / S. Yang, Y. Huang, Q. Zhao // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 878740.
207. Zacharia, L. C. Ras Suppressor-1 (RSU-1) in Cancer Cell Metastasis: Friend or Foe? / L. C. Zacharia, T. Stylianopoulos, V. Gkretsi // *Crit. Rev. Oncog.* – 2017. – Vol. 22 (3–4). – P. 249–253.
208. Zagryazhskaya, A., Zhivotovsky, B. MiRNAs in lung cancer: a link to aging / A. Zagryazhskaya, B. Zhivotovsky // *Ageing. Res. Rev.* – 2014. – Vol. 17. – P. 54–67.
209. Zhang, L. Epigenetics in Health and Disease / L. Zhang, Q. Lu, C. Chang // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 1253. – P. 3–55.
210. Zhang, L. Role of miR-520b in non-small cell lung cancer / L. Zhang, S. Yu // *Exp. Ther. Med.* – 2018. – Vol. 16. – P. 3987–3995.
211. Zhao, X. miR-1258 Regulates Cell Proliferation and Cell Cycle to Inhibit the Progression of Breast Cancer by Targeting E2F1 / X. Zhao // *BioMed Research International.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 1480819.