

На правах рукописи

ТАЛИПОВ ОРИФЖОН АБСАМАТИЛЛАЕВИЧ

**РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК В ПРОГНОЗЕ И
ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва — 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Воротников Игорь Константинович

Официальные оппоненты:

Бит-Сава Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, детской онкологии и лучевой терапии Санкт-Петербургского государственного педиатрического университета, заведующая отделением опухолей молочной железы ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)».

Стрельников Владимир Викторович, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией эпигенетики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «03» декабря 2020 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2020 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) является лидирующим онкозаболеванием у женщин в мире. По мировым данным, общая ежегодная ожидаемая смертность от РМЖ в мире составляет более 500000 женщин. Частота РМЖ в структуре мировой заболеваемости злокачественными опухолями достигает 12%, а смертности — 7% (Bray F., 2018). На сегодняшний день не существует достоверной и полной информации о точных механизмах возникновения РМЖ, по этой причине все результаты лечения остаются лишь относительно удовлетворительными.

Канцерогенез представляет собой многоуровневый процесс накопления генетических и эпигенетических нарушений в геноме клеток, приводящих к их неконтролируемому росту и делению, и в дальнейшем, к образованию метастазов (Peixoto A., 2019). Механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов служат фактором клеточной защиты от развития многих заболеваний, включая злокачественные опухоли молочных желез. Однако, в случае системных нарушений, вызванных множеством факторов, возникают изменения в структуре генов. Эти изменения, в конечном итоге, могут приводить к аномальному метилированию (Peixoto A., 2019). Процесс аномального метилирования двунаправленный: с одной стороны, наблюдается гиперметилирование промоторных областей ряда генов-супрессоров опухолевого роста, с другой – деметилирование онкогенов. Таким образом, изменение статуса метилирования промоторных районов некоторых генов является характерной чертой опухолевых клеток, причем аномальное метилирование наблюдается уже на ранних этапах канцерогенеза. Изменения метилирования промоторных районов ряда генов были показаны для РМЖ, и рака других локализаций (Rauscher G.H., 2015).

В настоящее время уже получены убедительные данные о том, что в опухолях разных локализаций происходит нарушение регуляции генов микроРНК и сами малые РНК могут выступать в роли онкогенов или опухолевых супрессоров (Vannini I., 2018). Известно, что при злокачественных новообразованиях значения статуса аномального метилирования многих микроРНК могут смещаться в ту или иную сторону, в зависимости от тканевого происхождения опухоли, микроокружения и генов-мишеней, участвующих в канцерогенезе опухоли (Padrão N.A., 2017; Toiyama Y., 2017). Аномальное метилирование генов микроРНК может быть следствием различных

причин, таких как, делеции, амплификации хромосомных локусов микроРНК, мутации или нарушение регуляции транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию микроРНК (Loginov V.I., 2015).

Изучение молекулярных особенностей механизма развития злокачественных опухолей и их ассоциация с клиническими проявлениями делает диагностику этих заболеваний более информативной, а также лежит в основе создания методов персонализированной терапии и оценки риска рецидива. Разработка методов ранней диагностики онкологических заболеваний является общей проблемой для опухолей различных локализаций. Однако и до момента обнаружения злокачественной опухоли и после того как она уже обнаружена, возникает необходимость дополнительной характеристики опухоли для оптимального выбора дальнейшей тактики лечения.

Таким образом, несмотря на многообразие предполагаемых факторов онкогенеза, необходим дальнейший поиск новых биологических маркеров диагностики и прогноза эффективности лечения РМЖ. На основании вышеизложенного были сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования

Изучить непосредственные, отдаленные результаты лечения и прогноз заболевания у больных раком молочной железы с учетом влияния молекулярно-генетических факторов (метилирования генов микроРНК).

Задачи исследования

1. Изучить частоту изменения метилирования промоторных CpG-островков 10 генов микроРНК (*miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375*) в опухолевых образцах и неповрежденной ткани молочной железы.
2. Изучить особенности клинического течения и прогноз рака молочной железы в зависимости от уровня метилирования генов микроРНК в первичной опухоли молочной железы.
3. Провести анализ возможных корреляций между клиническими данными течения заболевания, эффективностью лечения, прогнозом и метилированием промоторных регионов генов микроРНК.
4. Оценить выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия в первичной опухоли молочной железы метилирования генов микроРНК и от эффективности проведенной терапии.

5. Разработать алгоритм прогнозирования течения заболевания по совокупности выявленных эпигенетических и клинических данных, влияющих на выживаемость больных РМЖ.

Методы и методология исследования

Работа основана на анализе ретроспективных данных комплексного обследования и лечения 70 больных раком молочной железы, получавших лечение в НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина с 2004 по 2017 гг.

Молекулярно-генетические исследования провели на базе лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии» (заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Брага Э.А.)

Оценка метилирования CpG-районов промоторных областей генов *miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375* проводилась методом метил-специфичной ПЦР, основанной на бисульфитной конверсии ДНК.

Для статистической обработки результатов проведенного исследования все данные 70 больных РМЖ сформированы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL v. 2010г. Полученные результаты обработаны стандартными пакетами STATISTICA, v. 10 и IBM SPSS Statistics, v. 21.

Научная новизна

Впервые изучен совместный профиль метилирования группы генов микроРНК при люминальных А и В (В-Her2-негативный и В-Her2-позитивный), Her2-позитивном и трижды-негативном подтипах РМЖ. Впервые выявлен высокий уровень метилирования генов микроРНК (*miR-124a-1/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-130b*) в опухолевых клетках РМЖ. Показано, что метилирование промоторных районов генов *miR-124a-2* и *miR-107* значимо коррелирует со степенью дифференцировки опухолевых клеток, а генов *miR-127*, *miR-137* — с клинической стадией заболевания. Впервые обнаружено, что метилирование гена *miR-107* коррелирует с редкими морфологическими типами опухолей. Также на уровне тенденции ($0.05 < p < 0.1$) отмечена высокая частота метилирования генов *miR-127* в опухолях с низкой дифференцировкой. Метилирование *miR-124a-3* специфически ассоциирует с высоким уровнем экспрессии антигена Ki-67, а метилирование *miR-375* с опухолями нелюминального типа. Таким образом, определено,

что гены *miR-124a-2*, *miR-107*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-124a-3*, *miR-375* связаны с развитием и прогрессией опухоли, нарушение регуляции которых участвует в патогенезе РМЖ. Полученные данные свидетельствуют о нарушении регуляции исследуемых микроРНК в патогенезе РМЖ. Выявленную зависимость между метилированием промоторных регионов генов микроРНК (*miR-124a-2*, *miR-107*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-124a-3*, *miR-375*) и клинико-патологическими признаками РМЖ можно использовать для неинвазивной диагностики, стратификации больных РМЖ, при оценке прогноза заболевания и разработке индивидуальной тактики лечения пациентов.

Теоретическая и практическая значимость

Впервые изучен профиль метилирования генов микроРНК (*miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375*) у больных с разными клинико-патологическими признаками РМЖ. Показано, что метилирование промоторных районов изученных генов связано с развитием и прогрессией РМЖ. Полученные данные рекомендовано использовать как дополнительные маркеры при определении молекулярных подтипов РМЖ. Впервые выдвинута гипотеза о синергизме генов микроРНК и их регуляторных эффекторах, связанных с ключевыми процессами канцерогенеза.

Полученные данные можно использовать для неинвазивной диагностики РМЖ и стратификации больных, а также при оценке прогноза заболевания и разработке индивидуальной тактики лечения пациентов.

Личный вклад

Автор самостоятельно провел тщательный анализ отечественной и зарубежной литературы по избранной научной теме, изучил степень разработанности проблемы, на основании чего были сформулированы цель и задачи исследования. Соискателем сформирована база данных, произведена обработка и статистический анализ ретроспективного клинического материала. Также автор проанализировал полученные результаты исследований, сформулировал выводы и оформил диссертационную работу.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки»), области исследования п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии,

иммунологии, биохимии и др.») и п.3 «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики».

Положения, выносимые на защиту

Результаты лечения РМЖ зависят от молекулярного подтипа опухоли и её клиничко-морфологических, гормональных, молекулярно-генетических, иммуногистохимических и иммунологических параметров. В частности, при уровне экспрессии Ki-67 более 20% достоверно выше частота отдаленных метастазов (>3-5 раз) и смертности пациентов (6 раз), и ниже общая выживаемость (78,6% против 90,9%).

Впервые изучен профиль метилирования генов микроРНК: *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137*, *miR-130b*, что позволило обнаружить аномально высокую частоту метилирования этих генов при РМЖ. При этом метилирование промоторных районов генов *miR-124a-2* и *miR-107* значимо коррелирует со степенью дифференцировки опухоли, а генов *miR-127*, *miR-137* — с клинической стадией заболевания. Метилирование гена *miR-107* коррелирует с редкими типами РМЖ.

Внедрение результатов исследования

Результаты работы внедрены в практику онкологического отделения хирургических методов лечения №15 (комбинированного лечения опухолей молочной железы) НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 26 июня 2020 года с участием лабораторий и отделений ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 4 научные работы, из них 3 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 153 источников (20 отечественных и 133 зарубежных). Материал диссертации иллюстрирован 15 рисунками и 23 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Настоящая работа основана на анализе ретроспективных данных комплексного обследования и лечения 70 больных РМЖ, получавших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2004 по 2017гг.

Среднее время наблюдения за больными РМЖ, включенными в исследование, составило $56 \pm 47,2$ месяца (от 4,5 до 222,0 месяцев, медиана 37,6 месяца). В исследование включены 70 женщин в возрасте от 30 до 72 лет (средний возраст $51,9 \pm 9,8$ лет, медиана 54 года). Большинство составили пациентки от 40 до 60 лет. В исследовании преобладали пациентки со II (51,4%) и III (31,4%) стадией заболевания. Диагноз был верифицирован гистологически и иммуногистохимически. Преобладали пациенты с гистологическими заключениями: инфильтративный протоковый рак; и по степени дифференцировки злокачественных клеток: умеренная степень дифференцировки – G II. У 42 пациенток выявлено метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов. В таблице 1 представлено распределение больных по молекулярно-биологическим подтипам. Люминальный подтип А установлен у 19 больных; Люминальный подтип В-Her2-негативный – у 13 больных, и в 23 случаях – люминальный подтип В-Her2-позитивный. Другие молекулярные подтипы РМЖ наблюдались — в 15 случаях: трижды-негативный — в 10 и нелюминальный Her2 (+) позитивный подтип – в 5 случаях (Таблица 2).

Таблица 1 - Распределение больных по молекулярно-биологическим подтипам

Подтипы РМЖ	Количество больных	Процент (%)
Люминальный А	19	27,1
Люминальный В Her2 негативный подтип	13	18,6
Люминальный В Her2 позитивный подтип	23	32,9
Нелюминальный Her2 позитивный	5	7,1
Трижды-негативный	10	14,3
Итого	70	100

Из 70 пациенток включенных в исследование, 55 пациентам выполнена радикальная мастэктомия (РМЭ), в том числе РМЭ с одномоментной реконструкцией эндопротезом и 15 пациентам радикальная резекция молочной железы.

Таблица 2 - Распределение больных в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ и вида адъювантного лечения

Вид адъювантного лечения	Подтипы РМЖ				
	люминальный			нелюминальный Her2 – позитивный (n=5)	Трижды - негативный (n=10)
	A (n=19)	B-Her2-негативный (n=13)	B-Her2-позитивный (n=23)		
Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	Абс (%)	
ХТ	15 (79,0%)	12 (92,3%)	23 (100%)	5 (100%)	10 (100%)
ЛТ	2 (10,5%)	4 (30,8%)	6 (26%)	5 (100%)	9 (90,0%)
ГТ	19 (100%)	13 (100%)	23 (100%)	-	-
ТТ			23 (100%)	5 (100%)	
ХТ — химиотерапия, ЛТ — лучевая терапия, ГТ — гормонотерапия, ТТ - таргетная терапия					

После операции химиотерапию получили 65 пациентов, лучевая терапия проведена 26 пациентам, гормонотерапия – 55 пациентам.

Генетические методы исследования

Молекулярно-генетические исследования провели на базе лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (заведующий лабораторией – д.б.н., проф. Брага Э.А.)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты молекулярно-генетических исследований опухолевых образцов и гистологически неизмененных тканей молочных желез

В исследовании изучено метилирование 10 генов микроРНК. Из них, частота метилирования генов *miR-124a-1*, *-124a-3*, *-125b-1*, *-127*, *-137*, *-130b* в опухоли была статистически значимо выше, чем в образцах гистологически неизменной ткани молочной железы. Обращает на себя внимание, что наиболее часто при РМЖ наблюдалось метилирование гена *miR-124a-1* (75,7%, n=53 против 27,1%, n=19, p<0,05), чем в образцах гистологически неизменной ткани молочной железы. Чуть реже в нашем исследовании наблюдалось метилирование гена *miR-125b-1* и составило 48,6%

($n=34$, $p<0,05$), тогда как в образцах нормальной ткани молочной железы лишь у 4 больных выявлено метилирование данного гена (Таблица 3).

Частота метилирования генов *miR-124a-1*, *-124a-3*, *-137*, *-130b* в гистологически неизменной ткани варьировала в диапазоне 10,0-27,1%. Установленное повышение частоты метилирования этих генов в условно нормальной ткани может означать, что события, выявленные нами на молекулярном уровне, опережают изменения происходящие на гистологическом уровне, что может свидетельствовать о вовлеченности близлежащей ткани в опухолевой процесс. Вероятно, метилирование этих генов относится к ранним событиям в патогенезе РМЖ, что может служить основанием для их использования с целью ранней диагностики РМЖ.

Таблица 3 - Частота метилирования генов микроРНК в парных образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы ($n=70$)

Ген	Ткань молочной железы				$p <$
	Опухолевая		Нормальная		
	абс.	%	абс.	%	
<i>miR-124a-1</i>	53	75,7	19	27,1*	$p < 0,05$
<i>miR-124a-2</i>	16	22,9	17	24,3	1,0000
<i>miR-124a-3</i>	27	38,6	7	10,0*	$p < 0,05$
<i>miR-125b-1</i>	34	48,6	4	5,7*	$p < 0,05$
<i>miR-127</i>	21	30,0	-	-*	$p < 0,05$
<i>miR-137</i>	26	37,1	14	20,0*	$p < 0,05$
<i>miR-203a</i>	17	24,3	16	22,9	1,0000
<i>miR-375</i>	29	41,4	20	28,6	0,1559
<i>miR-130b</i>	26	37,1	10	14,3*	$p < 0,05$
<i>miR-107</i>	12	17,1	7	10,0	0,3237

* различия достоверны по сравнению с нормальной тканью, $p < 0,05$

Были сопоставлены данные по конкордантному изменению статуса метилирования исследованных генов микроРНК в тканях РМЖ и было выявлена статистически значимая взаимосвязь между следующими генами микроРНК: *miR-124a-1*

и *miR-124a-2*; *miR-124a-1* и *miR-137*; *miR-124a-3* и *125b-1*; *miR-124a-3* и *miR-137*; *miR-127* и *miR-107* (Таблица 4).

Таблица 4 - Величина статистически значимой взаимосвязи частот метилирования (кометилирования) микроРНК в тканях РМЖ

<i>miR-</i>	<i>124a-1</i>	<i>124a-2</i>	<i>124a-3</i>	<i>125b-1</i>	<i>127</i>	<i>137</i>	<i>107</i>
<i>124a-1</i>		0,308	-	-	-	0,297	-
<i>124a-2</i>	0,308		-	-	-	-	-
<i>124a-3</i>	-	-		0,242	-	0,302	-
<i>125b-1</i>	-	-	0,242		-	-	-
<i>127</i>	-	-	-	-		-	0,281
<i>137</i>	0,297	-	0,302	-	-		-
<i>107</i>	-	-	-	-	0,281	-	

Полученные данные по кометилированию исследованных генов микроРНК могут свидетельствовать о том, что данные микроРНК предположительно участвуют в регуляции одних и тех же процессов в клетке, нарушение которых может приводить к прогрессированию РМЖ. Таким образом, полученные пары можно использовать как маркер прогрессии РМЖ.

Результаты сравнения молекулярно-генетического статуса люминального и нелюминального РМЖ

Был проведен анализ статуса метилирования 10 генов микроРНК (*miR-107*, *miR-124a-1/2/3*, *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-130b*, *miR-137*, *miR-203a* и *miR-375*) в зависимости от иммуногистохимического статуса опухоли. Также проанализировали изменение частоты метилирования исследованных генов в парных образцах опухоли и гистологически нормальной ткани молочной железы в отдельных группах с люминальным и нелюминальным гистотипом РМЖ. Было показана статистически значимые ($p \leq 0.05$) различия в частоте метилирования генов *miR-124a-1*, *miR-125b-1* и *miR-127* в опухоли и гистологически неизменной ткани молочной железы независимо от иммуногистотипа (люминального и нелюминального). В то же время показали статистически значимое изменение частоты метилирования генов *miR-124a-3* и *miR-130b* в опухоли относительно неизменной ткани только при люминальном РМЖ ($p=0,00001$ и $p=0,0103$, соответственно). Кроме того, при люминальном РМЖ было

отмечено увеличение частоты метилирования *miR-137* в опухоли по сравнению с неизменной тканью в 2 раза ($p=0,053$) (Рисунок 1).



Рисунок 1 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах люминального и нелюминального РМЖ

Также были сопоставлены данные по конкордантному изменению статуса метилирования исследованных генов микроРНК у пациенток с люминальным и нелюминальным РМЖ. Для люминального РМЖ были характерны взаимосвязь между генами *miR-124a-1* и *miR-124a-2*; *miR-124a-2* и *miR-107*; *miR-124a-3* и *miR-137*; *miR-127* и *miR-107* (Таблица 5). Для нелюминального РМЖ было найдено всего две значимые кометилируемые пары с высокой степенью конкордантности: *miR-124a-1* и *miR-137*; *miR-375* и *miR-107*.

Полученные пары можно использовать как дополнительные маркеры при дифференцировке люминального и нелюминального РМЖ.

Таблица 5 - Величина статистически значимой взаимосвязи частоты метилирования генов микроРНК в образцах люминального РМЖ

	124a-1	124a-2	124a-3	125b-1	127	137	203a	375	130b	107
124a-1		0,309	-	-	-	-	-	-	-	-
124a-2	0,309		-	-	-	-	-	-	-	0,266
124a-3	-	-		-	-	0,463	-	-	-	-
125b-1	-	-	-		-	-	-	-	-	-

127	-	-	-	-		-	-	-	-	0,321
137	-	-	0,463	-	-		-	-	-	-
203a	-	-	-	-	-	-		-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-		-	-
130b	-	-	-	-	-	-	-	-		-
107	-	0,266	-	-	0,321	-	-	-	-	

Таблица 6 - Величина статистически значимой взаимосвязи частоты метилирования генов микроРНК в образцах нелюминального РМЖ

	124a-1	124a-2	124a-3	125b-1	127	137	203a	375	130b	107
124a-1		-	-	-	-	0,577	-	-	-	-
124a-2	-		-	-	-	-	-	-	-	-
124a-3	-	-		-	-	-	-	-	-	-
125b-1	-	-	-		-	-	-	-	-	-
127	-	-	-	-		-	-	-	-	-
137	0,577	-	-	-	-		-	-	-	-
203a	-	-	-	-	-	-		-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-		-	0,784
130b	-	-	-	-	-	-	-	-		-
107	-	-	-	-	-	-	-	0,784	-	

Анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в подтипах РМЖ и поиск кометилируемых пар микроРНК при РМЖ

Сравнение частоты метилирования в опухоли и гистологически неизменённой ткани молочной железы при люминальном А подтипе РМЖ выявило два статистически значимых изменений. Было обнаружено увеличение частоты метилирования в опухоли для *miR-124a-1* и *miR-125b-1* в 2,3 и 8 раз соответственно (16/19 против 7/19, $p=0,0069$ и 8/19 против 1/19, $p=0,0189$) (Рисунок 3). Как и в случае с общей выборкой мы проанализировали результаты совместного метилирования микроРНК для люминального А подтипа. Статистически значимые результаты были получены только для двух кометилируемых пар: *miR-127* и *miR-107* ($R=0,456$, $p<0,01$), *miR-124a-3* и *miR-137* ($R=0,457$, $p<0,01$).



Рисунок 2 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при люминальном А подтипе. * – статистически значимый результат ($p < 0.05$)

Также были показаны общие статистически значимые различия в частоте метилирования генов *miR-124a-1*, *miR-375* и *miR-127* в опухоли и гистологически неизменной ткани молочной железы у пациенток с Her2-негативным и Her2-позитивным подтипами люминального В РМЖ. Также, статистически значимое увеличение частоты метилирования *miR-137* показано для Her2-негативного люминального В подтипа РМЖ (Рисунок 3).



Рисунок 3 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при люминальном В Her2 – негативном подтипе

Для Her2-позитивного В подтипа РМЖ кроме вышеуказанных генов микроРНК, еще характерно было статистически значимое увеличение частоты метилирования следующих генов микроРНК: *miR-124a-3* (12/23 против 0/23, $p=0,0003$), *miR-125b-1* (12/23 против 1/23, $p=0,0006$) и *miR-130b* (10/23 против 2/23, $p=0,0165$) (Рисунок 4).



Рисунок 4 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при люминальном В Her2 – позитивном подтипе

Для трижды-негативного подтипа РМЖ статистически значимое различие в частоте метилирования опухолевых образцов относительно гистологически неизменной ткани было показано только для *miR-125b-1* (Рисунок 5)..

Для нелюминальный Her2 – позитивного подтипа значимых различий найдено не было, что, по-видимому, связано с малым количеством образцов (n=5).



Рисунок 5 - Профиль метилирования генов микроРНК в образцах РМЖ и гистологически неизменной ткани молочной железы при трижды-негативном подтипе

Таким образом, наши результаты можно рассматривать как маркеры для дифференцировки разных подтипов РМЖ, а именно (люминального А, Her2-негативного В, Her2 - позитивного В и трижды-негативного подтипа РМЖ).

Анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в зависимости от клиничко-морфологических параметров опухоли молочной железы

По данным различных исследований при ряде опухолей отмечается ассоциация метилирования генов микроРНК с клиническими характеристиками опухоли. Нами был проведен анализ изменения частоты метилирования генов микроРНК в зависимости от размера опухоли, степени дифференцировки, поражения лимфатических узлов и от стадии заболевания. Выявлено статистически значимое увеличение частоты метилирования генов *miR-127* и *miR-137* на поздних стадиях по сравнению с I-II стадией заболевания ($R=0.503$, $p<0.001$ и $R=0.243$, $p<0.05$, соответственно) (Рисунок 6).

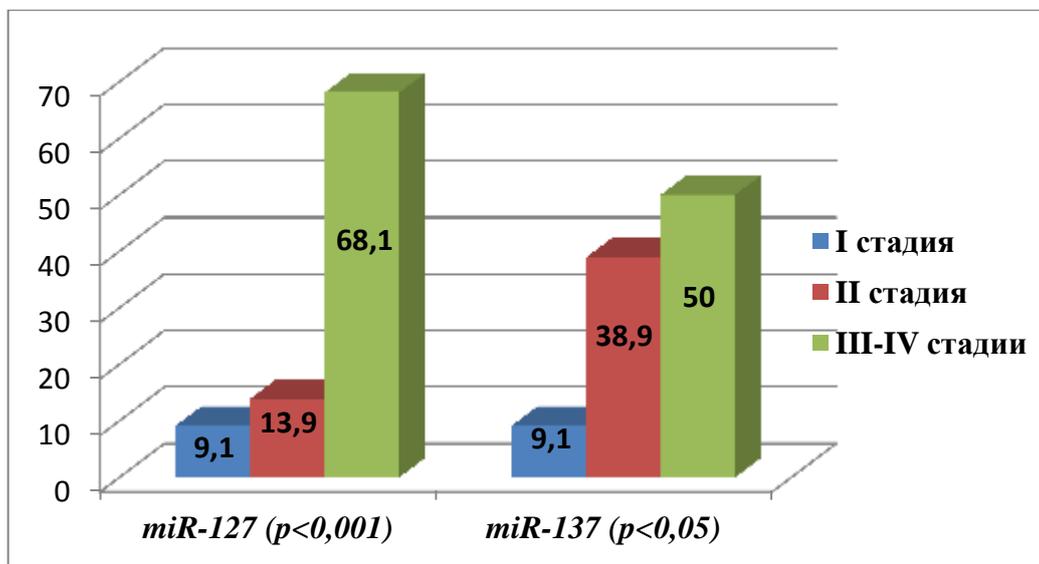


Рисунок 6 - Связь частоты метилирования генов *miR-127* и *miR-137* со стадией онкологического процесса при РМЖ (Количество пациенток со стадией I-IV соответственно 11, 36, 22 и 1)

Статистически значимо высокая частота метилирования показана для генов *miR-124a-2* и *miR-107* в образцах с низким уровнем дифференцировки клеток (G_3) ($R=0.245$, $p < 0.05$ и $R=0.250$, $p < 0.05$, соответственно) (Рисунок 7).

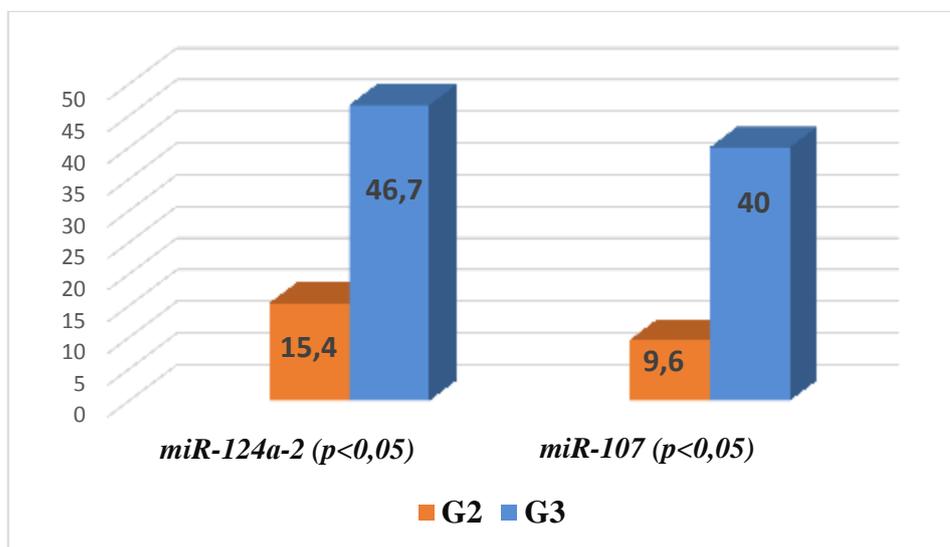


Рисунок 7 - Связь частоты метилирования генов *miR-124a-2* и *miR-107* со степенью дифференцировки опухолевых клеток при РМЖ. Связь с G (Количество пациенток с G соответственно 3, 52 и 15)

Также статистически значимо высокая частота метилирования показана для генов *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137* с наличием метастазов в лимфатических узлах (N_0 против

$N_{1,2}$) (9/28 против 25/42, $p=0.0302$; 0/28 против 21/42, $p<0.0001$; 6/28 против 20/42, $p=0.0425$, соответственно) (Рисунок 8).

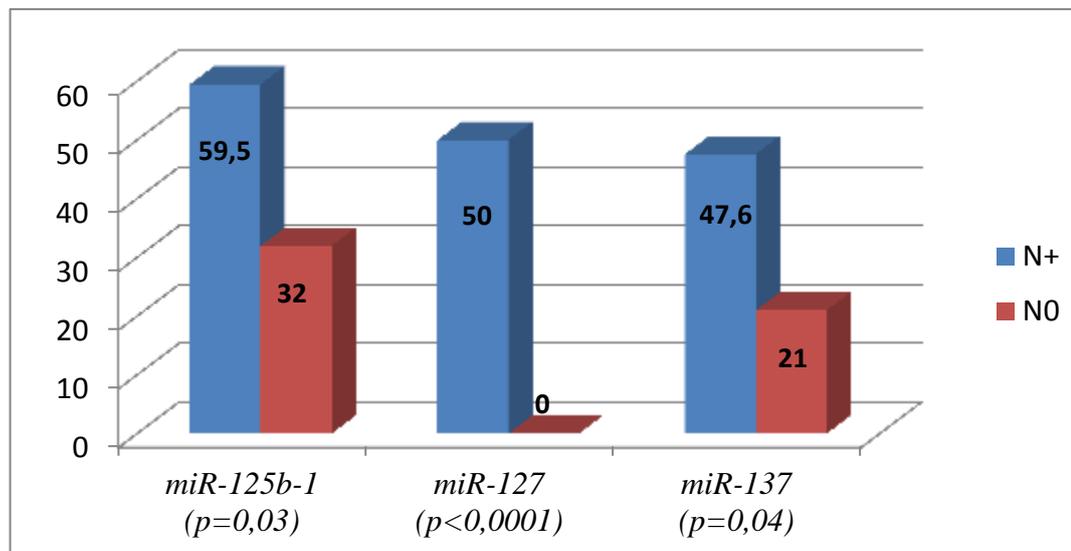


Рисунок 8 - Ассоциация метилирования генов *miR-125b-1*, *miR-127* и *miR-137* с наличием метастазов в лимфатических узлах (Количество пациенток с N+ и N0 соответственно 42 и 28)

Полученные данные подтверждают участие метилирования группы генов микроРНК в эпигенетической модификации ДНК в опухоли молочной железы во время прогрессии и метастазирования.

Отдаленные результаты лечения РМЖ в зависимости от метилирования генов микроРНК

В целом медиана наблюдения за нашими больными составила 37,6 месяцев. За время наблюдения умерло 12 пациентов. Прогрессия отмечалась у 14 пациентов. У 12 пациентов зарегистрированы отдаленные метастазы и лишь у 2х пациентов - местный рецидив.

Анализ отдаленных результатов лечения РМЖ в зависимости от метилирования промоторных CpG районов генов микроРНК выявила корреляцию гиперметилирования гена *miR-137* со смертностью заболевания (Рисунок 9), ее гиперметилирования характерно было для РМЖ в не зависимости от молекулярно-биологического подтипа РМЖ. У пациенток без метилирования этого гена смертность заболевания составила – 9,1% (4/44), с метилированием – 30,8% (8/26); $p=0,024$).

Смертность

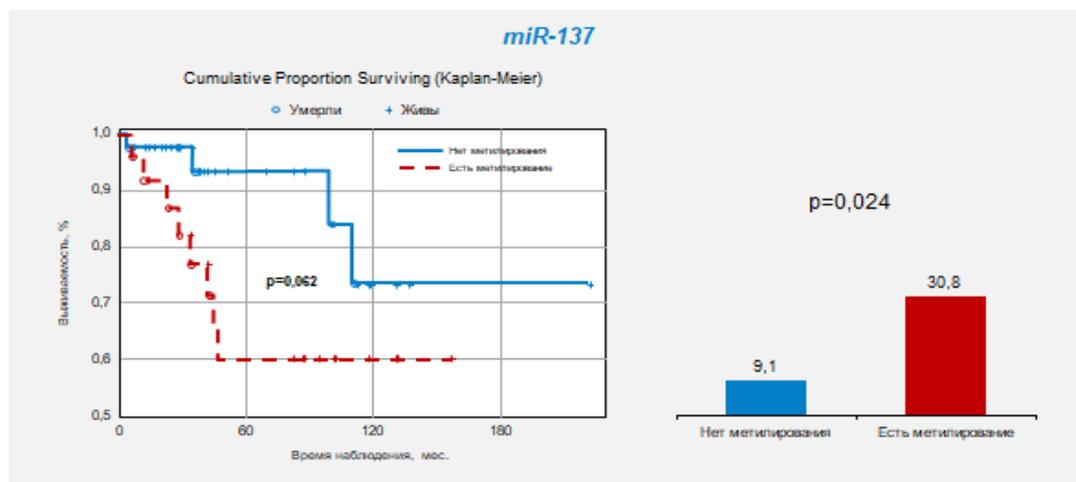


Рисунок 9 - Корреляция гиперметилирования гена *miR-137* со смертностью заболевания

Также выявлена корреляция гиперметилирования генов *miR-130b* и *miR-107* с прогрессированием заболевания (Рисунок 10). У пациенток без метилирования частота прогрессирования заболевания составила 11,4% (5/44) и 15,5% (9/58) соответственно, с метилированием этих генов - частота прогрессирования заболевания отмечена 34,6% (9/26), ($p=0,022$) и 41,7% (5/12), ($p=0,05$), соответственно.

Гиперметилирование гена *miR-130b* характерна для опухоли молочной железы независимо от иммуногистохимического статуса. Гиперметилирование гена *miR-107* характерно для опухоли молочной железы с низкой степени дифференцировки.

Прогрессирование

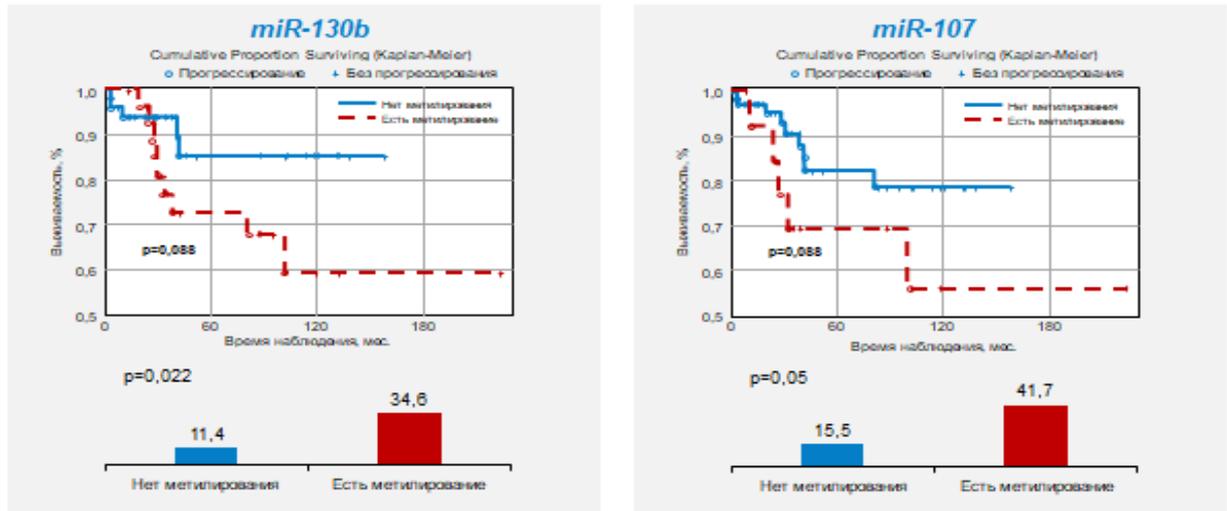


Рисунок 10 - Корреляция гиперметилирования генов *miR-130b* и *miR-107* с прогрессированием РМЖ

При рассмотрении отдельных подтипов РМЖ была выявлена корреляция частоты метилирования гена *miR-127* с увеличением смертности при люминальном А подтипе, для гена *miR-124a-3* с увеличением смертности и прогрессией заболевания при люминальным В-Her2-позитивном подтипе. (Рисунок 11). Для гена *miR-107* только с прогрессией заболевания при люминальным В-Her2-позитивном подтипе РМЖ (Рисунок 12).

Смертность по подтипам

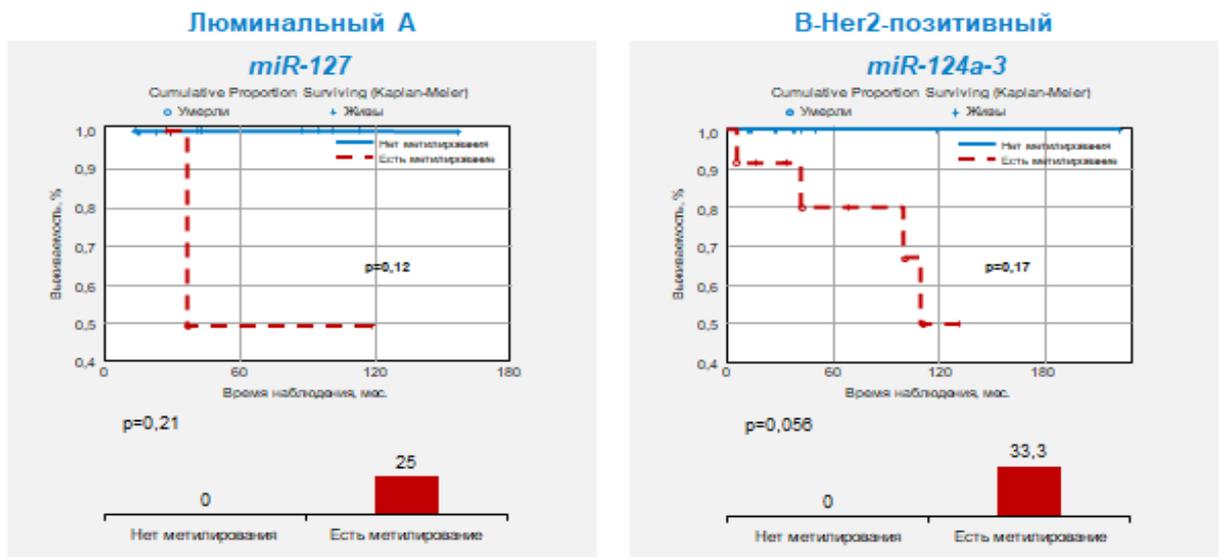


Рисунок 11 - Корреляция метилирования генов *miR-127* и *miR-124a-3* со смертностью заболевания при отдельных подтипах РМЖ

Прогрессирование по подтипам

В-Her2-позитивный

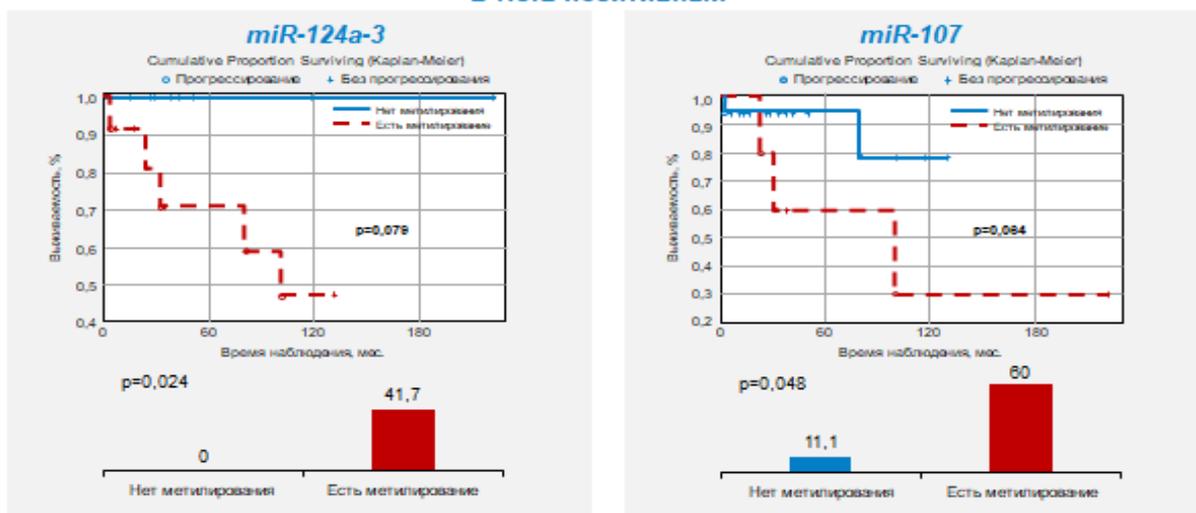


Рисунок 12 - Корреляция метилирования генов *miR-124a-3* и *miR-107* с прогрессией заболевания при отдельных подтипах РМЖ

ВЫВОДЫ

1. Исследование метилирования промоторных CpG-островков 10 генов микроРНК выявило, что у 6 из них (*miR-124a-1*, *miR-124a-3*, *miR-137*, *miR-127*, *miR-125b-1*, *miR-130b*) метилирование в опухолях молочной железы статистически достоверно превышает таковое в гистологически нормальной ткани (75.7%, 38,6%, 37,1%, 30.0%, 48.6% и 37,1%, соответственно), ($p < 0,01$).

2. Показано, что метилирование генов *miR-127* и *miR-137* коррелирует со стадией заболевания, причем наблюдается с высокой частотой при поздних стадиях РМЖ, по сравнению с I-II стадией. ($R_s = 0.503$, $p < 0.001$ и $R_s = 0.243$, $p < 0.05$, соответственно).

3. Определены гены микроРНК (*miR-124a-2* и *miR-107*) увеличение частоты метилирования которых ассоциировано с такими клинико-патоморфологическими признаками, как низкая степень дифференцировки опухоли (G_3) ($R_s = 0,245$, $p < 0.05$ и $R_s = 0.250$, $p < 0.05$ соответственно), а гена *miR-127* с увеличением размера опухоли (T_1/T_2 против T_3), 10/56 против 11/14, $p = 0,0018$). Выявлена статистически значимая зависимость частоты метилирования генов *miR-125b-1*, *miR-127*, *miR-137* с наличием метастазов в лимфатических узлах (N_0 против N_{1-2}) (9/28 против 25/42, $p = 0.0302$; 0/28 против 21/42, $p < 0.0001$; 6/28 против 20/42, $p = 0.0425$, соответственно), что дает

возможность рассматривать эти гены в качестве молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза РМЖ.

4. На основе анализа 5-летней выживаемости больных РМЖ показано, что у пациентов с метилированием гена *miR-137* выживаемость снижается – 69,2% против 89,9%, ($p=0,024$). У пациентов с метилированием *miR-130b* и *miR-107* прогрессирование заболевания отмечено 34,6% ($p=0,022$) и 41,7% ($p=0,054$), соответственно и наблюдалось чаще, чем у больных, у которых метилирования в этих генах не было (11,4% и 15,5%, соответственно).

5. Гены микроРНК, изменение метилирования которых достоверно коррелирует с клиническими, патоморфологическими, иммуногистохимическими параметрами опухолей молочной железы, могут быть предложены как маркеры для диагностики, дифференциальной диагностики и прогнозирования течения РМЖ и требуют дальнейшего изучения в более крупных исследованиях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рябчиков, Д.А. Роль метилирования генов микроРНК в различных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы. / Д.А. Рябчиков, И.А. Дудина, И.К. Воротников, О.А. Талипов // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т.8. – №1.– С. 5-11.

2. Рябчиков, Д.А. Роль метилирования 5 генов из района 3p21.31 в патогенезе молекулярных подтипов рака молочной железы. / Д.А. Рябчиков, Е.А. Филиппова, И.В. Пронина, А.М. Бурденный, И.К. Воротников, О.А. Талипов. //Практическая онкология. – 2019. - Т.20. – №1. – 29-43.

3. Рябчиков, Д.А. МикроРНК и их роль в патогенезе и диагностике рака молочной железы / Д.А. Рябчиков, И.К. Воротников, О.А. Талипов, С.В. Чулкова, В.И. Логинов, А.В. Снеговой, М.С. Винокуров, А.М. Казаков // Медицинский алфавит. – 2020. – №8. – С.12-15.

4. Талипов О.А. Метилирование генов супрессорных микроРНК при раке молочной железы / О.А. Талипов, Д.А. Рябчиков, С.В. Чулкова, И.К. Воротников, А.М. Казаков, В.И. Логинов, Т.П. Казубская, М.С. Винокуров, А.А. Осипова, Ф.К. Бердова. // Онкогинекология. – 2020. – Т. 34. – №2– С. 14-23