

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ микроРНК В РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Д.А. Рябчиков¹, С.В. Чулкова^{1,2}, О.А. Талипов¹, И.К. Воротников¹,
А.М. Казаков¹, А.А. Осипова¹, Ф.К. Бердова¹**

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

²ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Цель. Изучение особенностей метилирования генов микроРНК (miR-107, -124a-1/2/3, -125b-1, -127, -130b, -137, -203a, -375) при различных молекулярных подтипах рака молочной железы.

Материалы и методы. В исследование включены 70 больных с верифицированным диагнозом рак молочной железы в возрасте от 30 до 72 лет. Преобладали больные со II (51,4%) и III (31,4%) стадиями. Метастазы в лимфатических лимфоузлах наблюдались в 60% случаев. Инвазивный протоковый рак выявлен в 72,8% случаев, инвазивный дольковый рак — в 12,8% случаев, у 14,4% пациентов диагностированы другие формы рака. У большинства больных (74,2%) рак молочной железы (РМЖ) был умеренной дифференцировки, в 21,4% случаев отмечена низкая дифференцировка, и только 4,4% пациентов имели высококодифференцированную опухоль. Люминальный подтип А установлен у 27,1% больных; люминальный подтип В Her2-негативный — у 18,5% больных; в 32,8% случаях — люминальный подтип В Her2-позитивный, трижды негативный — у 14,2% и нелюминальный Her2(+) позитивный подтип — в 7,1% случаев. Методом метил-специфичной полимеразной цепной реакции (МС-ПЦР) изучен профиль метилирования генов микроРНК (miR-107, -124a-1/2/3, -125b-1, -127, -130b, -137, -203a, -375) в парных образцах опухолевой и гистологически неизменной ткани молочных желез. Полученные результаты обработаны стандартными пакетами STATISTICA, v. 10 и IBM SPSS Statistics, v. 21.

Результаты. В ходе работы установлено, что при люминальном А подтипе РМЖ частота метилирования miR-124a-1 и miR-125b-1 в опухолевой ткани увеличена в 2,3 (84,2% (n = 16) против 36,8% (n = 7), p = 0,0069) и в 8 раз (42,1% (n = 8) против 15,8% (n = 1), p = 0,0189), соответственно, по сравнению с неизменной тканью молочной железы.

При Her2-негативном и при Her2-позитивном люминальном В подтипе показаны достоверные различия в частоте метилирования генов микроРНК miR-124a-1, miR-375 в опухоли и гистологически неизменной ткани. Частота метилирования этих микроРНК при Her2-позитивном подтипе составила 69,5% (16/23) против 17,3% (4/23), (p = 0,0008) и 43,4% (10/23) против 13% (3/23), (p = 0,0472), соответственно. Для Her2-негативного рака эти значения были следующими: 84,6% (11/13) против 38,4% (5/13), (p = 0,04) и 69,2% (9/13) против 23% (3/13), (p = 0,04), соответственно.

Установлена высокая частота метилирования miR-124a-3 и miR-125b-1 при Her2-позитивном В подтипе РМЖ.

При трижды негативном подтипе метилирование miR-125b-1 в опухолевой ткани наблюдалось в большинстве образцов (70% (n = 7), p = 0,0075) и отсутствовало в гистологически неизменной ткани.

Заключение. Все исследуемые микроРНК демонстрировали повышенные уровни метилирования CpG-островков промоторных областей, что свидетельствует об их потенциальной диагностической значимости. Частота метилирования miR-375 достоверно повышена в опухоли при трижды негативном подтипе в сравнении с люминальным В Her2-негативным подтипом РМЖ. Для Her2-позитивного люминального В подтипа отмечен высокий процент метилирования 6 микроРНК (miR-124a-1, miR-375, miR-124a-3 и miR-125b-1, miR-127, miR-130b).

Ключевые слова: рак молочной железы, метилирование генов микроРНК.

RESULTS OF MICRORNA GENE METHYLATION ANALYSIS IN DIFFERENT BREAST CANCER SUBTYPES

**D.A. Ryabchikov¹, S.V. Chulkova^{1,2}, O.A. Talipov¹, I.K. Vorotnikov¹,
A.M. Kazakov¹, A.A. Osipova¹, F.K. Berdova¹**

¹ Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «N.I. Pirogov Russian National
Research Medical University», Moscow

Objective is to study methylation features of microRNA genes (miR-107, -124a-1/2/3, -125b-1, -127, -130b, -137, -203a, -375) in different breast cancer molecular subtypes.

Materials and Methods. The study comprised 70 patients with verified diagnosis of breast cancer aged from 30 to 70 years. Patients with stages II (51,4%) and III (31,4%) prevailed. Lymph node metastases were observed in 60% of cases. Invasive ductal carcinoma was identified in 72,8% of cases, invasive lobular carcinoma — in 12,8% of cases, 14,4% of patients were diagnosed with other types of cancer. Moderately differentiated breast cancer was detected in the majority of patients (74,2%), 21,4% of patients had poorly differentiated carcinomas, and only 4,4% of patients had well-differentiated tumors. Luminal A subtype is identified in 27,1% of patients; luminal B subtype Her2-negative — in 18,5% of patients; luminal B subtype Her2-positive — in 32,8% of cases, triple-negative — in 14,2% of cases and non-luminal Her2 (+) positive subtype — in 7,1% of cases. Methylation-specific polymerase chain reaction was used to examine the methylation profile of microRNA genes (miR-107, -124a-1/2/3, -125b-1, -127, -130b, -137, -203a, -375) in paired samples of tumor and histologically unchanged breast tissue. The result were processed using standard packages STATISTICA, v.10 and IBM SPSS Statistics, v.21.

Results. During this study it was found that in luminal A breast cancer subtype the frequency of miR-124a-1 and miR-125b-1 methylation in tumor tissue is increased by 2,3 times (84,2% (n = 16) versus 36,8% (n = 7), p = 0,0069), and by 8 times (42,1% (n = 8) versus 15,8% (n = 1), p = 0,0189), respectively in comparison with an unchanged breast tissue. Significant differences were shown in the frequency of microRNAs miR-124a-1, miR-375 gene methylation in the tumor and histologically unchanged tissue in Her2-negative and Her2-positive luminal B subtype. The frequency of these microRNA methylation in Her2-positive subtype made up 69,5% (16/23) versus 17,3% (4/23), (p = 0,0008) and 43,4% (10/23) versus 13% (3/23), (p = 0,0472) respectively. For Her2-negative cancer these values were: 84,6% (11/13) versus 38,4% (5/13), (p = 0,04) and 69,2% (9/13) versus 23% (3/13), (p = 0,04), respectively.

A high level of miR-124a-3 and miR-125b-1 methylation frequency in Her2-positive B subtype of breast cancer was observed.

In triple-negative subtype miR-125b-1 methylation in tumor tissue was observed in most samples (70% (n = 7), p = 0,0075) and was absent in histologically unchanged tissue.

Conclusion. The study revealed increased levels of methylation of CpG-islands of promoter regions of all microRNA, which indicates their potential diagnostic significance. Frequency of miR-375 methylation is reliably increased in a tumor in triple-negative subtype in comparison with luminal B Her2-negative subtype of breast cancer. A high percentage of methylation of 6 microRNA (miR-124a-1, miR-375, miR-124a-3, miR-125b-1, miR-127, miR-130b) was found in Her2-positive luminal B subtype.

Keywords: breast cancer, microRNA gene methylation.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является лидирующим злокачественным новообразованием у женщин во всем мире. Заболеваемость и смертность от РМЖ в структуре опухолей женской репродуктивной системы составляет 25,2 и 14,7%, соответственно [1]. За последние 10 лет в России количество женщин с диагнозом РМЖ стабильно увеличивается на 1,5% в год. Считается, что рост заболеваемости связан прежде всего с улучшением выявления раннего РМЖ, а также с естественным увеличе-

нием «женского генофонда» и, как следствие, с увеличением количества больных [2].

Лечение РМЖ представляет собой довольно сложную задачу, поскольку опухоль отличается выраженной гетерогенностью и разнообразным клиническим течением. Именно поэтому поиск маркеров, обладающих диагностической и прогностической значимостью, не утрачивает своей актуальности. Одним из таких маркеров на сегодняшний день могут быть микроРНК [3]. МикроРНК — это тип малой некодирующей РНК, содержащей 22–25 нуклеотидов, которая

способна подавлять экспрессию генов путем прямого связывания с 3'-нетранслируемой областью (UTR) их целевых генов [4]. Данное событие приводит к репрессии трансляции или деградации мРНК, которая становится нефункциональной. По данным разных авторов, от 30 до 60% генов человека являются мишенями микроРНК, изменение регуляции которой способствует прогрессии опухолей. Такое нарушение регуляции может возникать в результате гиперметилирования CpG-островков в промоторных районах генов микроРНК, что установлено при ряде злокачественных опухолей, в том числе при РМЖ [5–7].

Следует отметить, что метилирование преимущественно обнаруживается в опухолевых клетках и редко выявляется в нормальных клетках того же органа, при этом отмечается существенная разница уровней метилирования. В литературе встречаются сообщения о том, что метилирование можно обнаружить за несколько лет до манифестации РМЖ [8].

В зависимости от вида рака одна и та же микроРНК может играть роль как онкогена в случае если ее активность запускает процессы, способствующие развитию опухоли, так и гена-супрессора, если микроРНК подавляет экспрессию генов-супрессоров опухоли. Каждый вид злокачественных новообразований имеет определенный набор запускаемых микроРНК. При этом среди них можно выделить те микроРНК, которые наиболее часто встречаются только при конкретном виде рака [7].

Материалы и методы

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 2017 гг. Распределение больных в зависимости от возраста, стадии заболевания и гистологического вида РМЖ представлено в таблице 1. Медиана возраста больных составила 54 года. Большинство из них — пациентки от 40 до 60 лет. В исследовании преобладали больные II (51,4%) и III (31,4%) стадиями заболевания. Диагноз был верифицирован гистологически и иммуногистохимически. У 51 (72,8%) пациентки выявлен инвазивный протоковый рак, у 9 (12,8%) — инвазивный дольковый рак, у 4 (5,7%) — смешанный рак и у 6 (8,6%) — редкие формы РМЖ. У 42 (60%) пациенток выявлено метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов. У 52 (74,2%) пациенток из 70 наблюдалась G2 опухоль, у 15 (21,4%) — G3, и только у 3 (4,4%) пациентов — G1.

На рис. 1 представлено распределение больных по молекулярно-биологическим подтипам. Люминальный подтип А установлен у 19 (27,1%) больных; люминальный подтип В Her2-негативный — у 13 (18,5%) больных, и в 23 (32,8%) случаях — люминальный подтип В Her2-позитивный. Другие молекулярные подтипы РМЖ наблюдались в 15 (21,4%) случаях: трижды негативный — в 10 (14,3%) и Her2 (+) позитивный подтип — в 5 (7,1%) случаях.

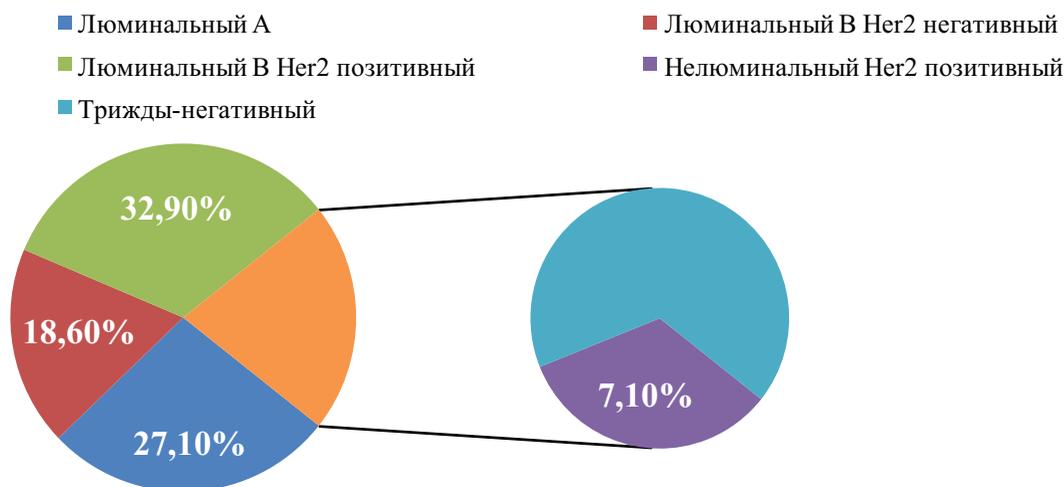


Рис. 1. Распределение больных по молекулярно-биологическим подтипам РМЖ

Распределение больных в зависимости от возраста, стадии заболевания и гистологического варианта РМЖ

Характеристика	Число больных, n = 70 (100%)
Возраст, медиана	54
30–39 лет	8 (11,4%)
40–49 лет	21 (30,0%)
50–59 лет	25 (35,7%)
60–69 лет	14 (20%)
70 и старше	2 (2,9%)
Стадия заболевания	
I	11 (15,7%)
IIa	20 (28,6%)
IIb	16 (22,8%)
IIIa	16 (22,8%)
IIIb	6 (8,6%)
IV	1 (1,4%)
Гистологический вариант РМЖ	
Инвазивный протоковый рак	51 (72,8%)
Инвазивный дольковый рак	9 (12,8%)
Смешанный рак	4 (5,7%)
Редкие формы	6 (8,6%)

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

Оценка метилирования CpG-районов промоторных областей генов *miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375* проводилась методом МС-ПЦР. Метод основан на бисульфитной конверсии ДНК. Это возможно благодаря способности молекулы гидросульфита взаимодействовать с цитозином в составе одноцепочечной ДНК с превращением последнего в урацил; 5-метилцитозин при тех же условиях модификации не подвергается. В дальнейшем проводится амплификация исследуемой последовательности ДНК с помощью ПЦР. При этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин, и только 5'-метилцитозин воспроизводится как цитозин. Реакция выполнена на амплификаторе T100 Thermal Cycler, Bio-Rad. Было проанализировано от 3 до 6 CpG-динуклеотидов для каждого гена.

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

Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 (Хи-квадрат). Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (точность $\geq 95\%$), также использовалась маргинальная значимость ($0,05 < p < 0,1$) для обозначения тенденции.

Результаты и обсуждение

Первым разделом нашей работы явилось изучение метилирования генов микроРНК (*miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375*) при различных молекулярных подтипах РМЖ. Полученные данные приведены

в табл. 2. По результатам сравнения установлено, что частота метилирования *miR-375* достоверно снижается в опухолях с трижды негативным подтипом в сравнении с люминальным В Her2-негативным подтипом РМЖ (20% против 69,2%, $p = 0,036$). Отмечена маргинально значимая ($0,1 > p > 0,05$) ассоциация увеличения частоты метилирования гена *miR-124a-2* в образцах люминального А подтипа РМЖ по сравнению с Her2-позитивным В люминальным подтипом ($p = 0,097$). Следует также отметить, что в образцах люминального А подтипа РМЖ частота метилирования *miR-137* и *miR-107* была в 2 и более раз ниже, чем в образцах с люминальным В подтипом: 26,3% против 53,9% и 5,3% против 30,8%, соответственно. Различия статистически недостоверны.

Таким образом, по результатам первого этапа работы установлено, что высокодостоверные различия в частоте метилирования изученных микроРНК касались только *miR-375*. Это было выявлено в отношении трижды негативного подтипа в сравнении с люминальным В Her2-негативным. Однако, с нашей точки зрения,

Частота метилирования микроРНК в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ

Ген	Люминальный А		Люминальный В Her2 негативный		Люминальный В Her2 позитивный		Нелюминальный Her2 позитивный		Трижды негативный	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
MIR	19	27,1	13	18,6	23	32,9	5	7,1	10	14,3
РМЖ										
124a-1	16	84,2	11	84,6	16	69,6	3	60,0	7	70,0
124a-2	8	42,1**	2	15,4	4	17,4**	0	0,0	2	20,0
124a-3	5	26,3	5	38,5	12	52,2	2	40,0	3	30,0
125b-1	8	42,1	5	38,5	12	52,2	2	40,0	7	70,0
127	4	21,1	4	30,8	8	34,8	3	60,0	2	20,0
137	5	26,3	7	53,9	8	34,8	2	40,0	4	40,0
203a	3	15,8	3	23,1	6	26,1	0	0,0	5	50,0
375	7	36,8	9	69,2*	10	43,5	1	20,0	2	20,0*
130b	8	42,1	4	30,8	10	43,5	2	40,0	2	20,0
107	1	5,3	4	30,8	5	21,7	1	20,0	1	10,0

* Трижды негативный подтип/люминальный В Her2-негативный подтип ($p \leq 0,05$).

** Люминальный А подтип /люминальный В Her2-позитивный подтип ($0,1 > p > 0,05$).

преждевременно утверждать, что определение частоты метилирования данной микроРНК с целью разграничения этих двух подтипов по фактору прогноза целесообразно. По нашим данным, метилирование *miR-375* при трижды негативном раке выявляется нередко — в 20% случаев. Поэтому мы не можем однозначно утверждать, что метилирование данной микроРНК характерно исключительно для люминального В Her2-негативного подтипа РМЖ. К тому же выборка в отношении трижды негативного РМЖ невелика ($n = 10$), и поэтому требуется проведение дальнейших исследований.

Интересные данные получены на следующем этапе работы. Нами было изучено метилирование микроРНК в опухоли и гистологически неизменной ткани при каждом подтипе РМЖ.

Люминальный А подтип РМЖ

Выполнено сравнение частоты метилирования в образцах опухолевой и неизменной ткани молочной железы при люминальном А подтипе РМЖ. Полученные в ходе анализа данные представлены на рис. 2. Как видно

из рисунка, при этом подтипе наблюдалось достоверное увеличение частоты метилирования *miR-124a-1* в опухоли: 84,2% (16/19) против 36,8% (7/19), $p = 0,0069$. По данным литературы, известно, что в результате метилирования промоторных CpG-островков экспрессия микроРНК *miR-124a* снижается, это отмечено при ряде опухолей, включая РМЖ [9–11]. В эксперименте установлено, что инактивация генов супрессорных микроРНК, к которым относится и *miR-124a*, сопряжена с прогрессированием опухолевого процесса [9].

Повышение частоты метилирования при люминальном А подтипе РМЖ также отмечено в отношении *miR-125b-1*: 42,1% (8/19) против 15,8% (1/19), ($p = 0,0189$). Изучая *miR-125b*, S. Wang с соавт. в своем исследовании продемонстрировали, что данная микроРНК, подавляя экспрессию целевых генов *ERBB2* и *ERBB3*, играет супрессорную роль [12]. Снижение экспрессии *miR-125b* было показано J. Nie и соавт. при метастазирующем РМЖ [13]. Оказалось, что данный факт связан с гиперметилированием промоторного CpG-островка *miR-125b-1* [14, 15]. Таким образом, гиперметилирование *miR-125b* ассоциируется с активным ростом опухоли.

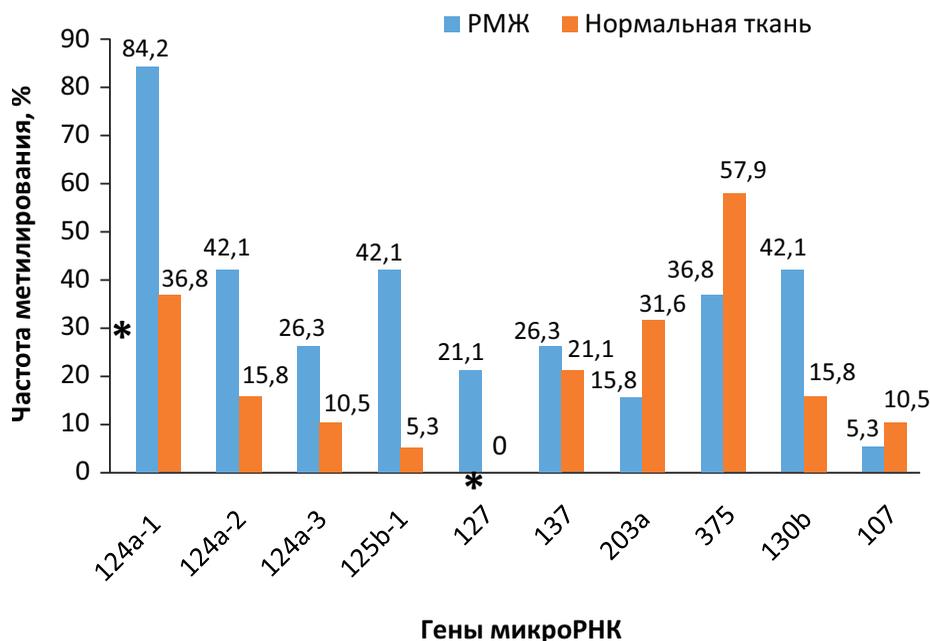


Рис. 2. Профиль метилирования генов микроРНК при люминальном А подтипе РМЖ:

* — статистически значимый результат ($p < 0,05$)

Резюмируя данный раздел работы, мы отметили, что при люминальном А подтипе РМЖ гиперметилирование микроРНК в опухолевой ткани выявлено в отношении двух видов: *miR-124a-1* и *miR-125b-1*. Полученные нами результаты о высокой частоте метилирования указанных микроРНК при РМЖ подтверждают данные мировой литературы [9–11, 13].

Люминальный В подтип РМЖ

Сравнение частоты метилирования в образцах опухолевой и неизменной ткани молочной железы при люминальном В подтипе выявило высокую частоту метилирования *miR-124a-1*, *miR-375*, которая наблюдалась и при Her2-позитивном, и при Her2-негативном РМЖ. Частота метилирования этих микроРНК при Her2-позитивном подтипе составила 69,5% (16/23) против 17,3% (4/23), ($p = 0,0008$) и 43,4% (10/23) против 13% (3/23), ($p = 0,0472$), соответственно (рис. 3). Что касается Her2–негативного рака, то эти значения были следующими: 84,6% (11/13) против 38,4% (5/13), ($p = 0,04$) и 69,2% (9/13) против 23% (3/13), ($p = 0,04$), соответственно (рис. 4).

Вместе с тем, нами установлены специфические для каждого подтипа изменения частот метилирования исследованных генов.

Her2-позитивный люминальный В подтип РМЖ

Выполненный анализ частоты метилирования генов для Her2-позитивного В типа РМЖ обнаружил различие высокой достоверности в частоте метилирования *miR-124a-3* и *miR-125b-1* (см. рис. 3). Метилирование *miR-124a-3* выявлялось в 52% (12/23) образцов опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной (0% (0/23)), $p = 0,0003$. Метилирование *miR-125b-1* было установлено в 52% (12/23) случаев, тогда как в неизменной ткани молочной железы — лишь в 4,3% (1/23) образцов ($p = 0,0006$).

Также для Her2-позитивного В подтипа РМЖ выявлено многократное превышение частоты метилирования *miR-127*: 34,7% (8/23), $p = 0,02$. Существуют исследования, свидетельствующие, что гиперметилирование промоторного CpG-островка *miR-127* приводит к снижению уровня экспрессии данной микроРНК при раке яичников, а также при РМЖ [15, 16]. Восстановление экспрессии *miR-127* в результате применения деметилирующих агентов способствует инактивации гена-мишени *miR-127* — *BCL-6*, что показано на клеточных линиях РМЖ в работе X. Zhao и соавт. [17]. Эти результаты позволяют отнести *miR-127*

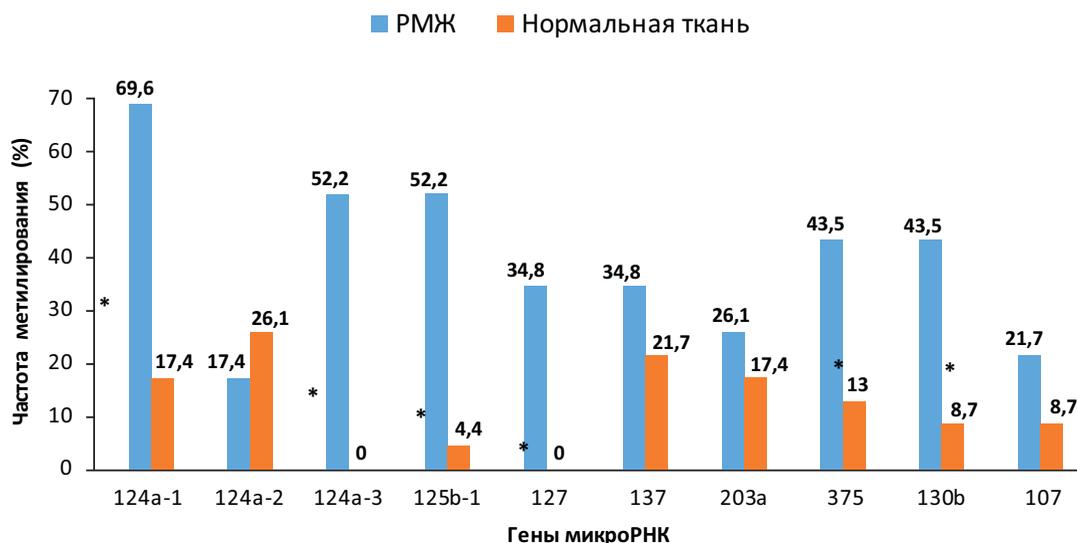


Рис. 3. Профиль метилирования генов микроРНК при люминальном В Her2-позитивном подтипе РМЖ: * — статистически значимый результат ($p < 0,05$)

к онкосупрессорным микроРНК, что подчеркивает ее диагностическую значимость.

Высокая частота метилирования при Her2-позитивном В подтипе РМЖ также отмечена для *miR-130b*. Наблюдалось увеличение частоты ее метилирования в 43,4% (10/23) образцов опухолевой ткани, тогда как в гистологически неизменной ткани метилирование было обнаружено в 8,6% (2/23). Различия носили высокодостоверный характер ($p = 0,01$). Необходимо отметить, что *miR-130b* проявляет черты гена-супрессора опухолевого роста, что продемонстрировано при опухолях яичников и молочной железы [18], где *miR-130b* подавляет экспрессию протоонкогена *PIEZO2* и гена *DLL1*, тем самым блокируя клеточную инвазию и миграцию [18, 19].

Her2-негативный В подтип РМЖ

Выполнено исследование частоты метилирования генов при Her2-негативном В подтипе РМЖ, которое установило увеличение частоты метилирования только одной микроРНК. Это касалось *miR-137*, метилирование которой наблюдалось в 53,8% (7/13) образцов ($p = 0,03$). Результаты анализа отображены на диаграмме (см. рис. 4).

Подводя итоги данного раздела работы, хотелось бы отметить несколько интересных наблюдений. Уже на первом этапе анализа обратило

внимание то, что высокая частота гиперметилирования двух микроРНК, а именно *miR-124a-1* и *miR-375*, встречается и при Her2-позитивном и при Her2-негативном люминальном В подтипе РМЖ. В отношении *miR-375* показано, что она ингибирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), подавляет жизнеспособность, миграцию и инвазию клеток РМЖ [20]. Поэтому наши данные, полученные в отношении высокоагрессивного подтипа РМЖ, подтверждают онкосупрессорные свойства *miR-375*.

Интересно отметить, что в экспериментальной работе А. Ward и соавт. установили, что восстановления экспрессии *miR-375* было достаточно, чтобы сенсibilизировать клетки опухоли к тамоксифену и частично обратить ЭМП [21]. Иными словами, высокая частота метилирования *miR-375* при люминальном В подтипе может быть маркером развития резистентности к тамоксифену.

Далее мы обнаружили чрезвычайно интересный факт. При Her2-позитивном люминальном В подтипе РМЖ спектр микроРНК, гиперметилирование которых мы установили, был значительно шире, чем при Her2-негативном подтипе. Кроме того, метилирование этих микроРНК в опухолевой ткани встречалось значительно чаще по сравнению с гистологически неизменной тканью. Этот факт нам представляется весьма любопытным и требует глубокого

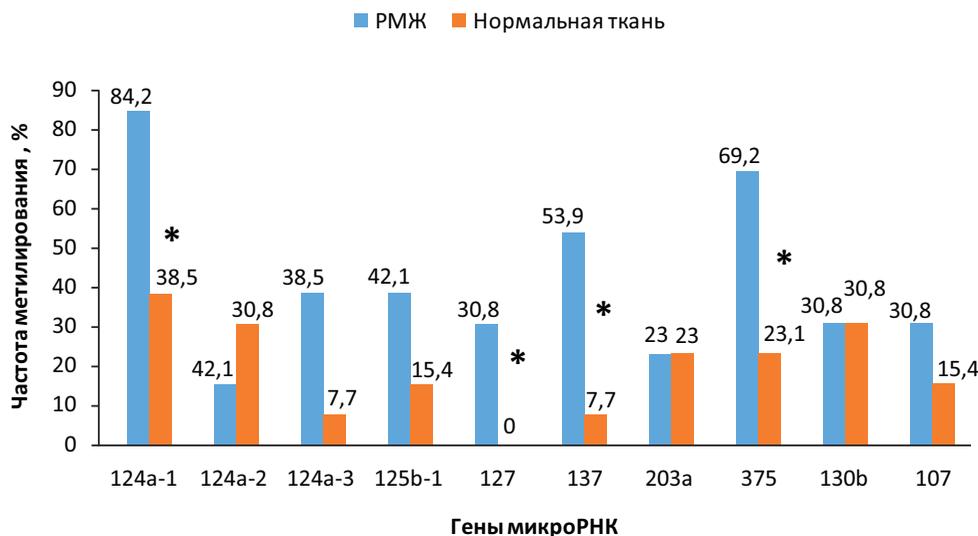


Рис. 4. Профиль метилирования генов микроРНК при люминальном В Her2-негативном подтипе РМЖ: * — статистически значимый результат ($p < 0,05$)

осмысления. Вполне вероятно, что патогенетические механизмы Her2-позитивного люминального В подтипа РМЖ существенно отличаются. Возможно, эпигенетическое влияние может приводить к активации различных сигнальных путей при данном виде рака. Мы полагаем, что в таком случае довольно затруднительным становится делать вывод о диагностической значимости отдельных микроРНК. При данных обстоятельствах следует рассматривать расширенную панель из нескольких микроРНК. Широкий спектр вовлеченных микроРНК, возможно, указывает на то, что эпигенетическая

нестабильность является важным событием в канцерогенезе Her2-позитивного люминального В подтипа РМЖ.

Нелюминальные подтипы РМЖ

Нами выполнено сравнение частоты метилирования в образцах опухолевой и неизменной ткани молочной железы при нелюминальном Her2-позитивном подтипе. Для Her2-позитивного подтипа РМЖ статистически значимых различий найдено не было, что, по-видимому, связано с малым количеством образцов ($n = 5$).

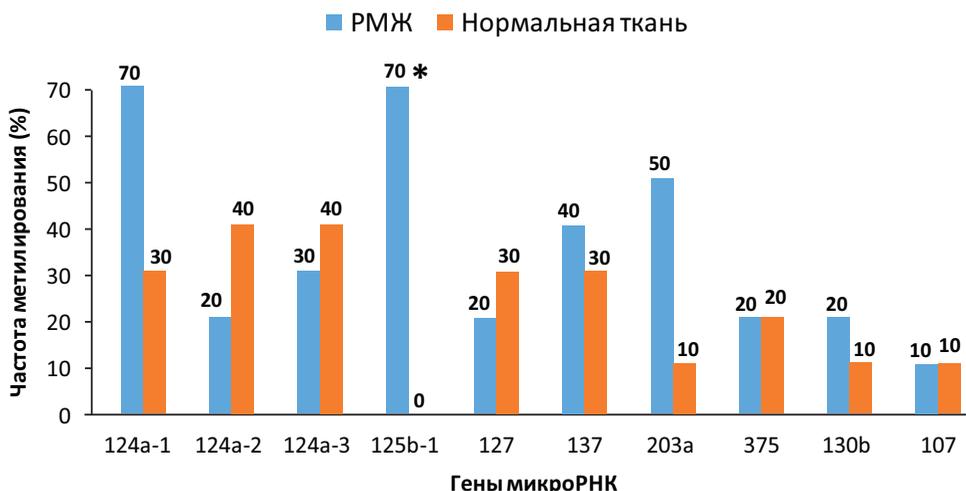


Рис. 5. Профиль метилирования генов микроРНК при трижды негативном подтипе: * — статистически значимый результат ($p < 0,05$)

Выполненный анализ частоты метилирования при трижды негативном РМЖ установил, что в опухолевой ткани гиперметилирование *miR-125b-1* наблюдается достоверно чаще, чем в гистологически неизменной ткани, что составило 70% (7/10) против 0% ($p = 0,0075$). Полученные результаты представлены на рис. 5. Ранее нами было показано, что метилирование *miR-125b-1* ассоциировано с параметрами прогрессирования РМЖ [22].

Таким образом, по нашим данным, нелюминальные подтипы РМЖ отличаются одинаковой частотой метилирования в опухоли по сравнению с гистологически неизменной тканью практически по всем изученным *miR*. Учитывая небольшую выборку больных по этой группе, данный факт требует дальнейшего изучения.

Заключение

Выполненное исследование установило, что все изученные микроРНК демонстрировали повышенные уровни метилирования CpG-островков промоторных областей при РМЖ, что подтверждает литературные данные. Частота метилирования микроРНК варьировала при

разных молекулярно-биологических подтипах. При каждом подтипе отмечен определенный набор метилированных микроРНК. При люминальном А подтипе РМЖ наблюдалось достоверное увеличение частоты метилирования *miR-124a-1* и *miR-125b-1*. При люминальном В подтипе установлено повышение частоты метилирования *miR-124a-1*, *miR-375*, которое наблюдалось и при Her2-позитивном, и при Her2-негативном РМЖ. Высокая частота метилирования *miR-375* при люминальном В подтипе может быть маркером развития резистентности к тамоксифену.

Особый интерес вызвали результаты, полученные в ходе изучения частот метилирования микроРНК при Her2-позитивном подтипе. При данном молекулярно-биологическом подтипе РМЖ значительное превышение частоты метилирования установлено для нескольких микроРНК. Это весьма важное наблюдение. Учитывая, что люминальный В подтип отличается большими размерами опухоли, частым поражением лимфоузлов и рецидивированием, использование панели из нескольких микроРНК для установления прогноза РМЖ может быть полезным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Рожкова Н.И., Прокопенко С.П., Мазо М.Л. Диагностика и лечение рака молочной железы: что изменилось за 20 лет // *Гинекология Эндокринология*. — 2018. — Т. 2. — № 146. — С. 35–40.
3. Рябчиков Д.А. Роль микроРНК в канцерогенезе и прогнозе злокачественных новообразований молочной железы / Рябчиков Д.А., Абдуллаева Э.И., Дудина И.А. и др. // *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России*. — 2018. — 18(2). — С. 1–20. Доступно по: <http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v18/docs/ryabchikov.pdf>.
4. Рябчиков Д.А. МикроРНК и их роль в патогенезе и диагностике рака молочной железы / Рябчиков Д.А., Воронников И.К., Талипов О.А., Чулкова С.В., Логинов В.И., Снеговой А.В., Винокуров М.С., Казаков А.М., Хагажеева М.Н., Бердова Ф.К. // *Медицинский алфавит*. — 2020. — № 8 (422) (Диагностика и онкотерапия 1). — С. 12–15. doi: 10.33667/2078–5631–2020–8(422) — 12–15.
5. Toiyama Y. Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer / Toiyama Y., Okugawa Y., Tanaka K. // *Gastroenterology*. 2017;153(6):1634–1646.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.037.
6. Чулкова С.В. Перспективы использования микроРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров меланомы / Чулкова С.В., Рябчиков Д.А., Дудина И.А. и др. // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2019. — 18(4). — С. 51–56. doi: 10.17650/1726–9784–2019–18–4–51–56.
7. Bertoli G. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer / Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. // *Theranostics*. 2015;5(10):1122–1143. doi: 10.7150/thno.11543.
8. Бурденный А.М. Роль гиперметилирования промоторных районов генов RASSF1A и MGMT в развитии рака молочной железы и яичников / Бурденный А.М., Чельшева Д.С., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Сельчук В.Ю., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. // *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. — 2015. — Т. 26. — № 2. — С. 39–44.

9. Lujambio A. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells / Lujambio A., Ropero S., Ballestar E., Fraga M.F., Cerrato C., Setién F., Casado S., Suarez-Gauthier A., Sanchez-Cespedes M., Git A., Spiteri I., Das P.P., Caldas C., Miska E., Esteller M. // *Cancer Res.* 2007;67:1424–1429.
10. Furuta M. MiR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma / Furuta M., Kozaki K.I., Tanaka S., Arai S., Imoto I., Inazawa J. // *Carcinogenesis.* 2010;31:766–776.
11. Peixoto A. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks / Peixoto A., Relvas-Santos M., Azevedo R., Santos L.L., Ferreira J.A. // *Front Oncol.* 2019;9:e380. doi: 10.3389/fonc.2019.00380.
12. Wang S. Functional cooperation of miR-125a, miR-125b, and miR-205 in entinostat-induced downregulation of erbB2/erbB3 and apoptosis in breast cancer cells / Wang S., Huang J., Lyu H., Lee C.K., Tan J., Wang J., Liu B. // *Cell Death Dis.* 2013;4:e556. doi: 10.1038/cddis.2013.79.
13. Nie J. MiR-125b regulates the proliferation and metastasis of triple negative breast cancer cells via the Wnt/ β -catenin pathway and EMT / Nie J., Jiang H.C., Zhou Y.C., Jiang B., He W.J., Wang Y.F., Dong J. // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019;83(6):1062–1071. doi: 10.1080/09168451.2019.1584521.
14. Filippova E.A. A Group of Hypermethylated miRNA Genes in Breast Cancer and Their Diagnostic Potential / Filippova E.A., Loginov V.I., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Burdenny A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A. // *Mol Biol (Mosk).* 2019;53(3):421–429. doi: 10.1134/S0026898419030054.
15. Pronina I.V. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression / Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. // *Gene.* 2017;604:1–8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018.
16. Loginov V.I. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis / Loginov V.I., Pronina I.V., Burdenny A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Khodyrev D.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. // *Gene.* 2018 Jul 1;662:28–36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005.
17. Zhao X. MicroRNA-127 is downregulated by Tudor-SN protein and contributes to metastasis and proliferation in breast cancer cell line MDA-MB-231 / Zhao X., Duan Z., Liu X., Wang B., Wang X., He J., Yao Z., Yang J. // *Anat Rec (Hoboken).* 2013;296(12):1842–1849. doi: 10.1002/ar.22823.
18. Lou W. Five miRNAs-mediated PIEZO2 downregulation, accompanied with activation of Hedgehog signaling pathway, predicts poor prognosis of breast cancer / Lou W., Liu J., Ding B., Jin L., Xu L., Li X., Chen J., Fan W. // *Aging (Albany NY).* 2019 May 6;11(9):2628–2652. doi: 10.18632/aging.101934.
19. Shui Y. miR-130b-3p inhibits cell invasion and migration by targeting the Notch ligand Delta-like 1 in breast carcinoma / Shui Y., Yu X., Duan R., Bao Q., Wu J., Yuan H., Ma C. // *Gene.* 2017 Apr 20;609:80–87. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.036.
20. Zou Q. MicroRNA-375 targets PAX6 and inhibits the viability, migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells / Zou Q., Yi W., Huang J., et al. // *Exp Ther Med.* 2017;14(2):1198–1204. doi: 10.3892/etm.2017.4593 PMID: PMC5525589 PMID: 28810579.
21. Ward A. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer / Ward A., Balwierz A., Zhang J.D., Küblbeck M., Pawitan Y., Hielscher T., Wiemann S., Sahin Ö. // *Oncogene.* 2013 Feb 28;32(9):1173–1182. doi: 10.1038/onc.2012.128. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22508479 DOI: 10.1038/onc.2012.128.
22. 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. — № 2 (34). — С. 14–23.

АВТОРЫ

Рябчиков Денис Анатольевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник хирургического отделения № 5 опухолей молочной железы ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail: dr.denisr@mail.ru

Ryabchikov Denis A., MD, RhD, DSc, Leading Researcher of the surgical Department No. 5 Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: dr.denisr@mail.ru

Чулкова Светлана Васильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 23; доцент кафедры онкологии и лучевой терапии лечебного факультета «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, e-mail: chulkova@mail.ru

Chulkova Svetlana V., MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Hematopoiesis Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478,

Moscow, Kashirskoye sh., 23; assistant professor of the Oncology and Radiotherapy Department of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Ostrovityanova str., 1, e-mail: chulkova@mail.ru

Талипов Орифжон Абсаматиллаевич, аспирант отделения хирургического лечения опухолей молочных желез № 5, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail: orifjon1986@mail.ru

Talipov Orifjon A., graduate student of the Department of Surgical Treatment of Breast Tumors № 5, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: orifjon1986@mail.ru

Воротников Игорь Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением хирургического лечения опухолей молочных желез № 5 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail:

Vorotnikov Igor K., MD, RhD, Prof., DSc, Leading Researcher of the surgical Department No. 5, Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail:

Казаков Алексей Михайлович, клинический ординатор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>, e-mail: kazakovich873@gmail.com

Kazakov Aleksey M., clinical intern, Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>, e-mail: kazakovich873@gmail.com

Осипова Александра Александровна, аспирант отделения хирургического лечения опухолей молочных желез № 5, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail: osipova@yandex.ru

Osipova Alexandra A., PhD student, Department of Oncology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center for Oncology named after N.N. Blokhina», Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: osipova@yandex.ru

Бердова Фарангиз Карамшоевна, аспирант отделения хирургического лечения опухолей молочных желез № 5, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, e-mail: farangizprecr@yandex.ru

Berdova Farangiz K., PhD student, Department of Oncology, Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center for Oncology named after N.N. Blokhina», Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow, Kashirskoye sh., 24, e-mail: farangizprecr@yandex.ru