

УДК 575:599.9

## Диагностическое значение группы генов микроРНК, гиперметилированных при немелкоклеточном раке лёгкого

Логоинов В.И.<sup>1,2</sup>, Рыков С.В.<sup>3</sup>, Ходырев Д.С.<sup>4</sup>, Пронина И.В.<sup>1</sup>, Казубская Т.П.<sup>5</sup>, Брага Э.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр». 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИгенетика). 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России. 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

<sup>5</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 115478, Москва, Каширское ш., д. 23

Эпигеномные исследования показали, что доля гиперметируемых генов микроРНК в несколько раз выше, чем белок-кодирующих генов, что делает их перспективными маркерами опухолей. Цель исследования — оценка диагностических характеристик группы гиперметилованных генов микроРНК при немелкоклеточном раке лёгкого (НМРЛ) и его подвидах, плоскоклеточном раке лёгкого (ПРЛ) и аденокарциноме (АК). На выборке из 39 образцов НМРЛ и в 20 образцах ткани лёгкого от «доноров» (умерших от неонкологического заболевания) методом МС-ПЦР проведён сравнительный анализ метилирования группы генов: MIR-125B-1, MIR-129-2, MIR-137, MIR-375. Методом ROC-анализа определены 6 потенциальных диагностических систем маркеров для НМРЛ, ПРЛ и АК, обладающие высокой чувствительностью (85–92%), специфичностью (90–95%) и величиной AUC 0,89–0,94; наилучшими показателями обладают системы для диагностики ПРЛ и НМРЛ.

**Ключевые слова:** рак лёгкого; метилирование генов микроРНК; ROC-анализ; диагностические системы маркеров; чувствительность; специфичность; AUC.

**Для цитирования:** Логоинов В.И., Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Брага Э.А. Диагностическое значение группы генов микроРНК, гиперметилованных при немелкоклеточном раке лёгкого. Патогенез. 2018; 16(3): 112–115

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.112-115

**Для корреспонденции:** Логоинов Виталий Игоревич, e-mail: loginov7w@gmail.com

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках фундаментальных исследований для государственных академий на 2013–2020 годы (№ 0520-2014-0030).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 21.08.2018

## Diagnostic value of a group of miRNA genes hypermethylated in non-small cell lung cancer

Loginov V.I.<sup>1,2</sup>, Rykov S.V.<sup>3</sup>, Khodyrev D.S.<sup>4</sup>, Pronina I.V.<sup>1</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>5</sup>, Braga E.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Medical Genetics Research Center, Moskvorech'ye str. 1, Moscow 115478, Russian Federation

<sup>3</sup> State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center «Kurchatov Institute», 1-st Dorozhnyi pr. 1, Moscow 117545, Russian Federation

<sup>4</sup> Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Medical Assistance and Medical Technologies of the Federal Biomedical Agency of Russia, Orekhovyi Blvd. 28, Moscow 115682, Russian Federation

<sup>5</sup> N.N.Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow 115478, Russian Federation

The high mortality in non-small cell lung cancer (NSCLC) and the lack of effective diagnostics indicate a need for new NSCLC biomarkers. Epigenomic studies have shown that the proportion of hypermethylated miRNA genes is several times higher than of protein-coding genes, which makes them promising markers. The aim of the study was to evaluate diagnostic characteristics of a group of hypermethylated miRNA genes in NSCLC and its subtypes, squamous cell lung cancer (SLC), and adenocarcinoma (AC). On a set of 39 NSCLC samples and 20 samples of lung tissue from «donors» (dead from non-oncological disease), methylation-specific PCR was used to perform a comparative analysis of methylation of a group of genes, MIR-125B-1, MIR-129-2, MIR-137, and MIR-375. The ROC-analysis identified 6 potential diagnostic systems of markers for NSCLC, SLC, and AC, which had high sensitivity (85–92%) and specificity (90–95%) and the AUC value of 0.89–0.94. The diagnostic systems for SLC and NSCLC showed the best values.

**Keywords:** lung cancer; miRNA gene methylation; ROC analysis; diagnostic marker systems; sensitivity; specificity; AUC.

**For citation:** Loginov V.I., Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Braga E.A. [Diagnostic value of a group of miRNA genes hypermethylated in non-small cell lung cancer]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(3): 112–115 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.03.112-115

**For correspondence:** Loginov Vitaly Igorevich, e-mail: loginov7w@gmail.com

**Funding:** The study was supported by the framework of basic research for state academies for 2013-2020 (No. 0520-2014-0030).

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

**Received:** 21.08.2018

## Введение

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) — самый распространенный вид рака среди онкопатологий человека. Ежегодно в мире заболевает около 1,8 миллиона и умирает 1,6 миллиона человек [1]. При обнаружении опухолей легкого на 1-й клинической стадии уровень 5-летней выживаемости пациентов поднимается от 15% до 70%. Отсутствие эффективной диагностики на ранних стадиях заболевания и высокая частота летальных исходов указывают на необходимость поиска новых биомаркеров НМРЛ.

В эпигенетических регуляторных механизмах при онкогенезе важная роль отводится микроРНК. Эпигеномные исследования показали, что доля генов микроРНК, подверженных метилированию, в несколько раз выше, чем белок-кодирующих генов, что делает их перспективными биомаркерами [2]. Ранее нами определено более 10 генов микроРНК, метилирование которых вовлечено в развитие и прогрессию НМРЛ, а также определены их некоторые потенциальные гены-мишени [3, 4]. При этом анализ гиперметилированных генов микроРНК и их роли в патогенезе НМРЛ другими авторами пока представлен единичными публикациями [5].

**Цель настоящего исследования** — оценка диагностических характеристик группы гиперметилированных генов микроРНК (*MIR-125B-1*, *MIR-129-2*, *MIR-137*, *MIR-375*) при НМРЛ и его подвидов, плоскоклеточного рака легкого (ПРЛ) и аденокарциномы (АК).

## Материалы и методы исследования

*Образцы опухолей НМРЛ* собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Анализировали парные образцы опухоли и гистологически неизменной ткани легкого, полученные от 39 больных НМРЛ, включавших 13 случаев аденокарцином (АК) и 26 плоскоклеточного рака легкого (ПРЛ), а также 20 образцов ткани легкого от умерших от неонкологических заболеваний (обозначенных как «доноры»). Отбор образцов проводили, как описано ранее [4]. Клинико-гистологические характеристики образцов по TNM-классификации приведены в табл. 1. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан», получено разрешение этического комитета ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина, а также информированное согласие больных.

*Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную ПЦР (МС-ПЦР)* проводили, как описано ранее [4]. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad Cyclor T-100 (Bio-Rad, США) с использованием олигонуклеотидов и условий амплификации, описанных в работах [3, 4].

*Статистический анализ* проводили с применением точного критерия Фишера в программе BioStat 6.1. Изменения считали значимыми при  $p < 0,05$ . Оптимальные системы маркеров определяли по результатам ROC-анализа, проведенного с помощью ресурса <http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC/>.

Таблица 1

Клинические и гистологические характеристики исследованных образцов НМРЛ (39)

Клинические и гистологические характеристики		АК (n = 13)	ПРЛ (n = 26)	НМРЛ (n = 39)
Клиническая стадия	I	6	7	13
	II	3	11	14
	III	3	8	11
	IV	1	0	1
Степень анаплазии	G1	1	2	3
	G2	7	15	22
	G3	5	9	14
Поражение лимфатических узлов	N0	7	14	21
	N1	3	7	10
	N2	3	5	8
Отдалённые метастазы	M0	12	26	38
	M1	1	0	1

Примечание. G1 — высокодифференцированный рак легкого (низкая степень анаплазии); G2 — умереннодифференцированный рак легкого; G3 — низкодифференцированный рак легкого (высокая степень анаплазии)

## Частота метилирования группы генов микроРНК в опухолях НМРЛ и его подвидов — ПРЛ и АК

Ген микроРНК		MIR-125B-1	MIR-129-2	MIR-137	MIR-375
НМРЛ	Опухоль	22/39, 56%	18/39, 46%	12/39, 31%	22/39, 56%
	Условная норма	4/39, 10%	6/39, 15%	0/39, 0%	9/39, 23%
	<i>p</i>	$3 \times 10^{-5}$	<b>0,006</b>	$7 \times 10^{-4}$	<b>0,005</b>
ПРЛ	Опухоль	16/26, 62%	11/26, 42%	10/26, 38%	15/26, 58%
	Условная норма	3/26, 12%	3/26, 12%	0/26, 0%	6/26, 23%
	<i>p</i>	$4 \times 10^{-4}$	<b>0,030</b>	<b>0,002</b>	<b>0,020</b>
АК	Опухоль	6/13, 46%	7/13, 54%	2/13, 15%	7/13, 54%
	Условная норма	1/13, 8%	3/13, 23%	0/13, 0%	3/13, 23%
	<i>p</i>	0,070	$\geq 0,100$	$\geq 0,100$	$\geq 0,100$
"Доноры"		1/20, 5%	0/20, 0%	0/20, 0%	2/20, 10%

Примечание. Даны число и процент образцов, в которых данный ген микроРНК метилирован, от общего количества образцов: НМРЛ ( $n = 39$ ), ПРЛ ( $n = 26$ ), АК ( $n = 13$ ). Условная норма соответствует парным образцам гистологически неизменной ткани легкого. «Доноры» соответствуют образцам умерших от неонкологических заболеваний ( $n = 20$ ). Показатели достоверных ( $p \leq 0,05$ ) различий даны полужирно.

## Характеристики 6 потенциальных диагностических систем маркеров для НМРЛ и его подвидов (ПРЛ и АК), рассчитанные на основе данных по метилированию 3 и 4 генов микроРНК

Набор генов	Вид рака	Criterion	AUC	Sn	Sp	<i>p</i>
MIR-125-B-1 MIR-129-2 MIR-137 MIR-375	НМРЛ	>0	0,92	90%	90%	$<10^{-4}$
	ПРЛ	>0	0,94	92%	90%	$<10^{-4}$
	АК	>0	0,89	85%	90%	$<10^{-4}$
MIR-125-B-1 MIR-129-2 MIR-137	НМРЛ	>0	0,91	85%	95%	$<10^{-4}$
	ПРЛ	>0	0,93	88%	95%	$<10^{-4}$
MIR-125-B-1 MIR-129-2 MIR-375	АК	>0	0,89	85%	90%	$<10^{-4}$

Примечание. Приведены значения площади под кривой (AUC, Area Under ROC-Curve), оптимальный критерий (Criterion), значения чувствительности (Sn, sensitivity) и специфичности (Sp, specificity)

## Результаты исследования и обсуждение

На выборке из 39 парных образцов (опухоль / условная норма) НМРЛ методом МС-ПЦР проведён сравнительный анализ метилирования 4 генов микроРНК: MIR-125B-1, MIR-129-2, MIR-137, и MIR-375. Частота метилирования этих генов значимо различалась в образцах опухолей и условной нормы (табл. 2). Как видно из этой таблицы, значимые различия выявлены не только для полной выборки НМРЛ, но и для подвида ПРЛ (выборка — 26 образцов).

На основании результатов о статусе метилирования 4 генов микроРНК в 39 образцах опухолей НМРЛ и 20 образцах ткани легкого от «доноров», методом ROC-анализа определены 6 потенциальных диагностических систем маркеров. Эти системы позволяют диагностировать НМРЛ и его подвиды (ПРЛ и АК) с высокой чувствительностью (85—92%), специфичностью (90—95%) и величиной AUC 0,89—0,94 (табл. 3).

При сравнении значений чувствительности (Sn) и специфичности (Sp), рассчитанных для 4- и 3-маркерных систем при НМРЛ и ПРЛ (табл. 3), интересно отметить, что 3-маркерная система позволяет повысить специфичность

от 90% до 95%, но за счет снижения чувствительности от 90% до 85% при НМРЛ и от 92% до 88% при ПРЛ. Самые высокие величины AUC, отражающие интегральную надёжность системы, и Sn получены для ПРЛ. Для диагностики АК оптимальными оказались та же 4-маркерная система и другое сочетание из 3 маркеров, параметры которых при этом идентичны (табл. 3). Значения Sn и AUC минимальны для АК, однако тоже соответствуют необходимому уровню, а именно величина AUC близка к 0,9, а величины Sn и Sp выше или равны 85%. Сравнительный анализ диагностического потенциала систем показал, что данные маркеры с наибольшей чувствительностью выявляют ПРЛ (табл. 3).

Следует отметить, что в литературе пока рассмотрены единичные варианты наборов микроРНК для диагностики или прогностики НМРЛ, причем основанные на профилях экспрессии микроРНК [6], однако не было предложено ни одного способа диагностики НМРЛ на основе гиперметилированных генов микроРНК. И стоит упомянуть, что проводить анализ метилирования генов микроРНК, как и белковых генов, технически легче, чем оценивать уровень экспрессии генов, тем более микроРНК.

## Список литературы

1. Hirsch F.R., Scagliotti G.V., Mulshine J.L., Kwon R., Curran W.J. Jr., Wu Y.L., Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017; 389(10066): 299-311. DOI: 10.1016/S0140-6736(16) 30958-8
2. Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия*. 2015; 80(2): 184-203. DOI: 10.1134/S0006297915020029
3. Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. *Генетика*. 2013; 49(7): 896-901. DOI: 10.1134/S1022795413070119
4. Брага Э.А., Логинов В.И., Пронина И.В., Ходырев Д.С., Рыков С.В., Фридман М.В., Казубская Т.П., Кубатиев А.А., Кушлинский Н.Е. Активация генов *RHOA* и *NKIRAS1* в опухолях легкого ассоциирована с потерей метилирования этих генов и с метилированием генов регуляторных микроРНК. *Биохимия*, 2015; 80(4): 568-581. DOI: 10.1134/S0006297915040124
5. Heller G., Altenberger C., Steiner I., Topakian T., Ziegler B., Tomasich E., Lang G., End-Pfutzenreuter A., Zehetmayer S., Dome B., Arns B.M., Klepetko W., Zielinski C.C., Zochbauer-Muller S. DNA methylation of microRNA-coding genes in non-small-cell lung cancer patients. *J. Pathol.* 2018; 245(4): 387-398. DOI: 10.1002/path.5079
6. Wang C., Ding M., Xia M., Chen S., Van Le A., Soto-Gil R., Shen Y., Wang N., Wang J., Gu W., Wang X., Zhang Y., Zen K., Chen X., Zhang C., Zhang C.Y. A Five-miRNA Panel Identified From a Multicentric Case-control Study Serves as a Novel Diagnostic Tool for Ethnically Diverse Non-small-cell Lung Cancer Patients. *EBioMedicine*. 2015; 2(10): 1377-85. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.07.034

## Сведения об авторах

Логинов Виталий Игоревич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»

Рыков Сергей Викторович — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории технологического развития Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» — ГосНИИГенетика)

Ходырев Дмитрий Сергеевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики Центра биомедицинских технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России

Пронина Ирина Валерьевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Казубская Татьяна Павловна — доктор медицинских наук, врач-онкогенетик, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Брага Элеонора Александровна — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр»

## References

1. Hirsch F.R., Scagliotti G.V., Mulshine J.L., Kwon R., Curran W.J. Jr., Wu Y.L., Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*. 2017; 389(10066): 299-311. DOI: 10.1016/S0140-6736(16) 30958-8
2. Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. [Methylation of miRNA genes and oncogenesis]. *Biokhimiya [Biochemistry]*. 2015; 80(2): 145-162. DOI: 10.1134/S0006297915020029 (in Russian)
3. Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Loginov V.I., Braga E.A. [Novel miRNA genes methylated in lung tumors]. *Genetica [Russian Journal of Genetics]*. 2013; 49(7): 782-786. DOI: 10.1134/S1022795413070119 (in Russian)
4. Braga E.A., Loginov V.I., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Rykov S.V., Burdennyi A.M., Friedman M.V., Kazubskaya T.P., Kubatiev A.A., Kushlinskii N.E. [Upregulation of *RHOA* and *NKIRAS1* genes in lung tumors is associated with loss of their methylation as well as with methylation of regulatory miRNA genes]. *Biokhimiya [Biochemistry]*. 2015; 80(4): 483-494. DOI: 10.1134/S0006297915040124 (in Russian)
5. Heller G., Altenberger C., Steiner I., Topakian T., Ziegler B., Tomasich E., Lang G., End-Pfutzenreuter A., Zehetmayer S., Dome B., Arns B.M., Klepetko W., Zielinski C.C., Zochbauer-Muller S. DNA methylation of microRNA-coding genes in non-small-cell lung cancer patients. *J. Pathol.* 2018; 245(4): 387-398. DOI: 10.1002/path.5079
6. Wang C., Ding M., Xia M., Chen S., Van Le A., Soto-Gil R., Shen Y., Wang N., Wang J., Gu W., Wang X., Zhang Y., Zen K., Chen X., Zhang C., Zhang C.Y. A Five-miRNA Panel Identified From a Multicentric Case-control Study Serves as a Novel Diagnostic Tool for Ethnically Diverse Non-small-cell Lung Cancer Patients. *EBioMedicine*. 2015; 2(10): 1377-85. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.07.034