

АССОЦИАЦИЯ УРОВНЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГРУППЫ ГЕНОВ микроРНК В ОПУХОЛИ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ VEGF В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ И ИХ ПОТЕНЦИАЛ В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА ВЫЖИВАЕМОСТИ¹

В. И. Логинов¹, Я. З. Плиева², А. А. Алферов², А. И. Колтунова², О. И. Вашкетова², Д. Н. Кушлинский³, Ю. Г. Паяниди², Д. В. Рогожин², К. И. Жордания², А. С. Шевчук², А. М. Бурденный¹, Э. А. Брага¹, Н. Е. Кушлинский²

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

³ КГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения» Минздрава Хабаровского края, г. Хабаровск

Цель исследования. Провести анализ ассоциации уровня метилирования генов микроРНК в опухоли с концентрациями VEGF плазмы крови больных раком яичников (РЯ) с оценкой их потенциала в отношении прогноза общей выживаемости.

Материал и методы. Обследовали 26 первичных, ранее не леченных больных серозным раком яичников в различных стадиях опухолевого процесса в соответствии с TNM-классификацией ВОЗ (2014). В представленной работе определены уровни метилирования 14 генов микроРНК (MIR124–2, MIR124–3, MIR125B-1, MIR127, MIR129–2, MIR132, MIR137, MIR203A, MIR34B, MIR34C, MIR375, MIR9–1, MIR9–3, MIR339) в 26 первичных опухолях и 19 перитонеальных метастазах у больных РЯ и сопоставлены с содержанием VEGF в плазме крови этих пациентов, показана их роль в оценке прогноза заболевания.

Результаты. У больных РЯ установлены прямые корреляционные связи концентраций VEGF в плазме крови с уровнями метилирования 5 генов микроРНК в опухолях (MIR124–2, MIR125B-1, MIR127, MIR129–2, MIR9–3) и 3 генов микроРНК в метастазах (MIR124–2, MIR124–3, MIR203A). Дисперсионный анализ подтвердил, что при увеличении концентраций VEGF в плазме крови выявлено статистически значимое повышение уровня метилирования 2 генов микроРНК в ткани опухоли: MIR124–2 и MIR127, а также выявлена сильная тенденция к различию медиан метилирования генов MIR129–2 и MIR9–3, причем различие в уровне метилирования гена MIR9–3 наблюдали только по медиане VEGF. Выявлена синхронность в изменениях содержания VEGF в плазме крови и уровня метилирования следующих 4 генов микроРНК: MIR124–2, MIR129–2, MIR9–2, MIR-339 в опухоли. Лучшие показатели общей выживаемости выявлены у больных РЯ с одновременно низкими уровнями как VEGF в плазме крови, так и уровня метилирования в опухоли группы из 3 генов микроРНК: MIR124–2, MIR125B-1, MIR375. Сочетания показателей VEGF в плазме крови с уровнем метилирования других исследованных генов микроРНК не показали связи с отдаленными результатами лечения. Выполненный многофакторный анализ (Proportional hazard (Cox) regression) связи общей выживаемости с концентрациями VEGF в плазме крови и уровнем метилирования в опухоли генов микроРНК (MIR124–2, MIR125B-1, MIR129–2, MIR375) показал, что последние влияют на отдаленные результаты лечения больных РЯ в большей степени, чем VEGF.

Заключение. Совместное определение концентраций VEGF в плазме крови с уровнями метилирования генов микроРНК в опухоли (MIR124–2, MIR125B-1, MIR129–2, MIR375) позволяет улучшить наше понимание патогенеза РЯ и уточнить прогноз заболевания у больных РЯ, что указывает на необходимость проведения дальнейших исследований.

Ключевые слова: рак яичников, VEGF, микроРНК, метилирование

¹ Исследование выполнено при поддержке государственным заданием № FGUFU-2022-0007 Министерства науки и высшего образования РФ учреждению ФГБНУ «НИИОПП».

ASSOCIATION OF THE METHYLATION LEVEL OF A GROUP OF microRNA GENES IN A TUMOR WITH THE CONCENTRATION OF VEGF IN THE BLOOD PLASMA OF OVARIAN CANCER PATIENTS AND THEIR POTENTIAL IN ASSESSING THE PROGNOSIS OF SURVIVAL

V. I. Loginov¹, Ya. Z. Pliyeva², A. A. Alferov², A. I. Koltunova², O. I. Vashketova², D. N. Kushlinskiy³, Yu. G. Payanidi², D. V. Rogozhin², K. I. Zhordania², A. S. Shevchyuk², A. M. Burdenniy¹, E. A. Braga¹, N. E. Kushlinskiy²

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology", Moscow

² Federal State Budgetary Institution "N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

³ Regional State Budgetary Educational Institution of Continuing Professional Education "Institute for Advanced Training of Healthcare Professionals" of the Ministry of Healthcare of Khabarovsk Region, Khabarovsk

Objective of the study — is to analyze the association between the level of methylation of miRNA genes in the tumor with concentrations of VEGF in the blood plasma of patients with ovarian cancer and to evaluate their potential for the prognosis of overall survival.

Materials and Methods. 26 primary patients, previously untreated, with serous ovarian cancer at various stages of the tumor process were examined in accordance with the TNM classification of WHO (2014). The present work reports the levels of methylation of 14 miRNA genes (MIR124–2, MIR124–3, MIR125B-1, MIR127, MIR129–2, MIR132, MIR137, MIR203A, MIR34B, MIR34C, MIR375, MIR9–1, MIR9–3, MIR339) identified in 26 primary tumors and 19 peritoneal metastases of patients with ovarian cancer; compares these levels with the content of VEGF in the blood plasma of these patients and underlines their role in the assessment of the prognosis of the disease.

Results. It was revealed, that there is a direct correlation between VEGF concentrations in the blood plasma of patients with ovarian cancer with the levels of methylation of 5 miRNA genes in the tumors (MIR124–2, MIR125B-1, MIR127, MIR129–2, MIR9–3) and 3 miRNA genes in metastases (MIR124–2, MIR124–3, MIR203A). Analysis of variance confirmed that with an increase in VEGF concentrations in the blood plasma, a statistically significant increase in the level of methylation of 2 miRNA genes in the tumor tissue was revealed: MIR124–2 and MIR127, and the strong tendency to a difference in the median methylation of MIR129–2 and MIR9–3 genes was found, whereby the difference in the level of methylation of MIR9–3 gene was observed only in the median of VEGF. Synchronicity in the changes of the VEGF content in blood plasma and the level of methylation of the following 4 miRNA genes- MIR124–2, MIR129–2, MIR9–2, MIR-339 in tumor was observed. The highest overall survival rates were found in ovarian cancer patients who had simultaneously low levels of VEGF in blood plasma and the level of methylation in the tumor of a group of 3 miRNA genes: MIR124–2, MIR125B-1, MIR375. Combinations of VEGF parameters in blood plasma with the level of methylation of the other miRNA genes that have been studied, didn't disclose any relationship with long-term results of the treatment. A multivariate analysis (Proportional hazard (Cox) regression) of the relationship between overall survival and VEGF concentrations in blood plasma and the level of methylation in the tumor of miRNA genes (MIR124–2, MIR125B-1, MIR129–2, MIR375) showed that the latter affect the long-term outcomes of the treatment of ovarian cancer patients to a greater extent than VEGF does.

Conclusion. The joint determination of VEGF concentrations in blood plasma with levels of methylation of miRNA genes in the tumor (MIR124–2, MIR125B-1, MIR129–2, MIR375) permits to enhance our understanding of ovarian cancer pathogenesis and to make more precise prognosis of the disease in ovarian cancer patients, which indicates the need for further research.

Keywords: ovarian cancer, VEGF, miRNA, methylation

Введение

Благодаря достижениям в развитии технологий секвенирования ДНК и РНК стало известно, что гены, кодирующие белки, составляют только 2 % генома человека, а подавляющая часть генома (до 70–90 %) тоже активно транс-

крибируется в виде некодирующих РНК, из которых наиболее изучены микроРНК (миРНК) [1, 2]. миРНК распознает свои комплементарные последовательности в 3'-нетранслируемом регионе (3'-НТР) мРНК-мишеней. В зависимости от комплементарности миРНК с участком

связывания в 3'-НТР мРНК-мишени их взаимодействие приводит либо к деградации мРНК-мишени, если она полностью комплементарна, либо к блокировке трансляции, если комплементарность частичная [3]. В соответствии с этими особенностями миРНК отличает широкая мультитаргетность, к ее мишеням относятся целый набор мРНК белок-кодирующих генов. Предполагают, что миРНК вовлечены в регуляцию до 60 % генов, кодирующих белки. В рамках проекта ENCODE установлено, что регуляция посредством миРНК преимущественно связана с регуляторными факторами, расположенными «ближе к вершине» генной сети, которые отличает значительное число взаимодействий [4]. Показано, что миРНК участвуют в регуляции таких фундаментальных биологических процессов, как клеточная пролиферация, дифференцировка, апоптоз, подвижность, адгезия, ангиогенез, ответ на стресс; при этом она задействована в регуляции ключевых сигнальных путей, в том числе в механизмах с обратной связью [5–7].

Нарушение экспрессии и регуляторной функции миРНК может быть одним из ключевых процессов в развитии разных патологий; миРНК вовлечены в генез более 300 заболеваний, включая онкологические [8, 9]. Количество публикаций по изучению роли миРНК в биологических процессах в патогенезе опухолей и направленных на определение генов-мишеней и сигнальных путей, в которых задействованы миРНК, растет лавинообразно [6, 10]. Подавляющее большинство опубликованных работ сосредоточено на определении конкретной мишени данной миРНК. Однако многие миРНК могут проявлять свои эффекты путем нацеливания на множественные гены, вовлеченные в один и тот же клеточный путь или в разные процессы; появилось понятие эндогенных мРНК, конкурирующих за связывание с миРНК [11]. Роль миРНК в активации протоонкогенов и подавлении генов-супрессоров опухолевого роста — важный механизм онкогенеза.

Рак яичников отличают высокие показатели летальности, и связано это с выявлением заболевания на поздних стадиях, осложнен-

ных метастазированием [12]. С другой стороны, уровень пятилетней выживаемости на I–II стадиях достигает 70–90 %. Для РЯ характерно не только метастазирование в лимфатические узлы и отдаленные органы, но и прежде всего метастазирование по брюшной полости. Причем перитонеальное метастазирование, вызывающее образование асцита, — наиболее частая причина неблагоприятного прогноза.

В настоящее время получены многочисленные и убедительные данные о роли миРНК и регулируемых ими генов-мишеней в патогенезе и метастазировании РЯ, а также ангиогенезе [9, 13–15]. На сегодняшний день можно сделать вывод, что регулирование миРНК может быть эффективным средством контроля экспрессии гена *VEGFA* и играет важную роль в патогенезе РЯ. Исследования, проведенные за последнее десятилетие, показали, что гиперэкспрессия ряда миРНК непосредственно или опосредованно приводила к снижению экспрессии гена *VEGFA*. Так, гиперэкспрессия миРНК: *miR-302a*, *miR-638*, *miR-195*, *miR-497*, *miR-140-5p*, *miR-126*, *miR-497*, *miR-29a*, *miR-655* прямо ингибировали экспрессию гена *VEGFA*. Тогда как гиперэкспрессия *miR-153*, *miR-874*, *miR-199-3p*, *miR-26b*, *miR-144-3p*, *miR-29c* и *miR-29b* вызывала непрямо ингибирование *VEGFA* за счет его действия на системы HIF1-A, STAT3, VEGFR1/2, пути PI3K/Akt и MAPK/ERK [16].

Цель настоящего исследования — анализ ассоциации уровня метилирования генов миРНК в опухоли с концентрациями VEGF плазмы крови больных РЯ и оценка их потенциала в отношении прогноза общей выживаемости.

Материалы и методы

Клинический материал. Исследованы образцы первичных опухолей у 26 ранее не леченных больных РЯ, которым проводили обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России в период с 2017 по 2021 г. У всех пациенток клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования первичных

опухолей и метастазов РЯ в соответствии с TNM-классификацией [17]. При морфологическом исследовании удаленных опухолей и метастазов у всех больных выявлена серозная аденокарцинома яичников. У 19 пациенток установлена III, у трех — II и у четырех — I стадия РЯ. Все больные получали комбинированную нео- или адъювантную химиотерапию таксанами и препаратами платины по общепринятым стандартным схемам. Образцы тканей и крови пациенток были взяты до лечения. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80 %) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином.

Выделение тотальной ДНК. ДНК выделяли из образцов ткани яичников по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при –20 °С. Качество и концентрацию ДНК определяли по оптической плотности при длине волны 260 нм на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Анализ метилирования генов миРНК. Метилирование генов миРНК анализировали методом количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени с применением бисульфитной конверсии ДНК (0,5–2,0 мкг), как описано ранее [18]. Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при –20 °С и использовали в качестве матрицы в МС-ПЦР в реальном времени по методу, опубликованному в работах [19, 20]. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР генов миРНК подобраны нами ранее [18, 21]. Набор реактивов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, США) по протоколу производителя. Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве пози-

тивного контроля 100 %-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”).

Определение концентрации VEGF. Концентрацию VEGF в образцах плазмы крови, полученной до начала специфического лечения по стандартной методике в присутствии EDTA, определяли с использованием набора реактивов для прямого иммуноферментного анализа Quantikine®, Human VEGF (R&D systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (“Siemens Healthcare Diagnostics”, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

Статистический анализ. Полученные данные по метилированию генов миРНК обрабатывали, используя в качестве параметра уровня метилирования показатель индекса метилирования (ИМ), который рассчитывали по формуле

$$\text{ИМ} = 100 \times M / (M + U),$$

где M — число метилированных копий гена, U — число неметилированных копий гена [18].

Значение ИМ рассчитывали для каждого образца. Статистическую значимость различий уровней метилирования оценивали с применением непараметрического U-теста Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили посредством расчета коэффициента корреляции Спирмена и уровня его значимости.

Расчет выживаемости проведен для 26 пациенток, которые находились под наблюдением в течение 3–5 лет. Их разделили на две подгруппы по уровню исследуемого маркера. При распределении пациенток на группы по уровням метилирования генов миРНК использовали медиану суммарной группы. С учетом результатов по отдаленным наблюдениям были выбраны пороговые уровни, соответствующие медиане метилирования исследуемых маркеров. Кривые выживаемости строили по методу Каплана-Мейера. При сравнении двух кривых выживаемости использовали логарифмический ранговый критерий (log-rank test), а также

модель Кокса, в основе которой лежит метод множественной регрессии при предположении пропорциональных рисков (Cox's test). Для всех расчетов значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Применяли поправку на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга и оценивали величину FDR (false discovery rate, частота ложного обнаружения). Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных IBM SPSS Statistics 22.

Результаты и обсуждение

У 26 больных РЯ до лечения исследовали концентрацию VEGF в плазме крови и уровень метилирования 14 генов миРНК (*MIR124-2*, *MIR124-3*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR137*, *MIR203A*, *MIR34B*, *MIR34C*, *MIR375*, *MIR9-1*, *MIR9-3*, *MIR339*) в ткани первичной опухоли. В таблице 1 представлены корреляционные зависимости между концентрациями VEGF в плазме крови больных РЯ и уровнями метилирования генов миРНК в опухоли.

Установлены статистически значимые прямые корреляционные зависимости между кон-

центрациями VEGF в плазме крови и уровнем метилирования 5 генов миРНК в опухоли (*MIR124-2*, *MIR125B-1*, *MIR127*, *MIR129-2*, *MIR9-3*) больных РЯ (табл. 1).

Дополнительно для оценки связи концентраций VEGF в плазме крови с уровнем метилирования генов миРНК в опухоли больных РЯ провели дисперсионный анализ. Для этого больных РЯ разделили на четыре подгруппы, ориентируясь на медиану и квантили концентраций VEGF в плазме крови, в которых рассчитали уровень метилирования генов миРНК (табл. 2). Дисперсионный анализ показал, что при увеличении концентраций VEGF в плазме крови больных РЯ выявлено статистически значимое повышение уровня метилирования 2 генов миРНК в ткани опухоли: *MIR124-2* и *MIR127*. В указанных группах обнаружена также сильная тенденция к различию медиан уровня метилирования генов *MIR129-2* и *MIR9-3*, причем различие в уровне метилирования гена *MIR9-3* в опухоли наблюдали только по медиане VEGF в плазме крови. Так, в группе из 13 больных РЯ с концентрацией в плазме крови VEGF < 45 пг/мл медиана

Таблица 1

Корреляционные связи между концентрацией VEGF в плазме крови и уровнем метилирования генов миРНК в опухоли больных РЯ

Показатель в плазме крови	Ген миРНК в опухоли яичников (n = 26)	Коэффициент корреляции Spearman (rs)	p-value
VEGF	<i>MIR124-2</i>	0,56	0,003
	<i>MIR124-3</i>	0,037	> 0,05
	<i>MIR125B-1</i>	0,46	0,02
	<i>MIR127</i>	0,48	0,013
	<i>MIR129-2</i>	0,46	0,017
	<i>MIR132</i>	0,26	> 0,05
	<i>MIR137</i>	0,08	> 0,05
	<i>MIR203A</i>	-0,12	> 0,05
	<i>MIR34B</i>	0,33	> 0,05
	<i>MIR34C</i>	0,06	> 0,05
	<i>MIR375</i>	0,01	> 0,05
	<i>MIR9-1</i>	0,29	> 0,05
	<i>MIR9-3</i>	0,49	0,011
	<i>MIR339</i>	0,39	0,05

Таблица 2

Уровень метилирования генов миРНК в опухоли больных РЯ при различных концентрациях VEGF в плазме крови

Ген миРНК в опухоли яичников	Концентрация VEGF в плазме крови, пг/мл				P K-W test
	< 15 (n = 6)	15–44,9 (n = 7)	45–94,9 (n = 7)	≥ 95 (n = 6)	
	Медиана; квартили	Медиана; квартили	Медиана; квартили	Медиана; квартили	
MIR124–2	10,2; 0,2–29,0	38,7; 29,5–78,4	56,9; 36,6–63,3	96,2; 35,4–97,5	0,049
MIR124–3	24,1; 15,6–38,0	21,1; 13,1–31,0	12,8; 78,6–15,2	32,1; 20,2–52,8	0,18
MIR125B–1	7,3; 3,3–42,6	37,7; 4,8–81,1	24,9; 20,2–82,7	60,2; 38,6–84,0	0,26
MIR127	5,1; 1,9–20,3	37,0; 36,4–67,3	35,4; 9,1–51,1	61,9; 36,4–76,4	0,022
MIR129–2	11,0; 5,7–27,0	26,7; 18,5–43,6	21,4; 5,7–51,2	50,8; 36,0–54,7	0,068
MIR132	9,4; 1,9–37,7	16,6; 0,8–49,3	6,3; 1,1–50,3	33,1; 11,0–50,0	0,64
MIR137	12,8; 4,4–20,9	19,3; 7,6–43,6	21,1; 10,7–31,9	15,9; 13,5–32,3	0,85
MIR203A	5,3; 3,3–7,6	20,5; 1,9–35,3	4,0; 1,6–16,6	3,3; 0,9–9,9	0,52
MIR34b	6,6; 0,2–13,9	11,3; 0,73–20,2	12,8; 9,0–18,5	13,3; 2,0–23,5	0,48
MIR34c	7,5; 2,0–13,8	12,3; 2,7–23,5	12,3; 2,0–18,4	10,4; 1,7–22,5	0,76
MIR375	5,0; 1,0–21,9	23,3; 11,0–27,1	18,6; 11,8–26,0	11,2; 3,7–12,6	0,1
MIR9–1	8,3; 0,6–10,3	9,1; 0,6–20,8	20,6; 9,0–35,6	9,2; 7,6–13,0	0,24
MIR9–3	11,6; 2,3–40,0	8,6; 7,2–16,2	45,1; 8,7–59,6	34,3; 26,8–50,4	0,1
MIR339	6,8; 1,5–10,9	12,5; 7,5–32,8	25,0; 4,6–43,8	19,1; 7,5–56,4	0,24

уровня метилирования гена миРНК *MIR9–3* составила 8,6 (2,7–20,6), тогда как в группе 13 пациенток с концентрацией VEGF ≥ 45 пг/мл медиана метилирования гена миРНК *MIR9–3* была статистически значимо выше и составила 39,7 ($p = 0,013$).

Таким образом, обнаружена положительная корреляционная связь концентраций VEGF в плазме крови больных РЯ с уровнем метилирования 5 генов миРНК в ткани опухоли: *MIR124–2*, *MIR125B–1*, *MIR127*, *MIR129–2*, *MIR9–3*.

Отдаленные результаты лечения больных РЯ с учетом концентрации VEGF в плазме крови и уровня метилирования генов миРНК в опухоли

Прежде всего провели анализ показателей общей выживаемости 26 больных РЯ с учетом порогового уровня VEGF (медианы 44,6 пг/мл) в плазме крови (рис. 1). При этом не выявили значимых различий в показателях общей вы-

живаемости между двумя группами пациенток с уровнями VEGF $< 44,6$ пг/мл и $\geq 44,6$ пг/мл ($p = 0,86$).

Для оценки связи концентраций VEGF в плазме крови и уровня метилирования генов миРНК в ткани опухоли с показателями общей выживаемости 26 больных РЯ общую группу пациенток разделили по медиане VEGF (44,6 пг/мл) и по медианам уровня метилирования генов миРНК на четыре подгруппы. В этих группах провели анализ частоты выявления сочетаний уровней маркеров (табл. 3), а также рассчитали показатели общей выживаемости при сочетании различных уровней исследованных маркеров.

Как следует из данных таблицы 3, для больных РЯ характерно преобладание одновременно либо низких, либо одновременно высоких значений VEGF в плазме крови и соответственно уровня метилирования четырех генов миРНК в опухоли: *MIR124–2*, *MIR129–2*, *MIR9–3*, *MIR–339*.

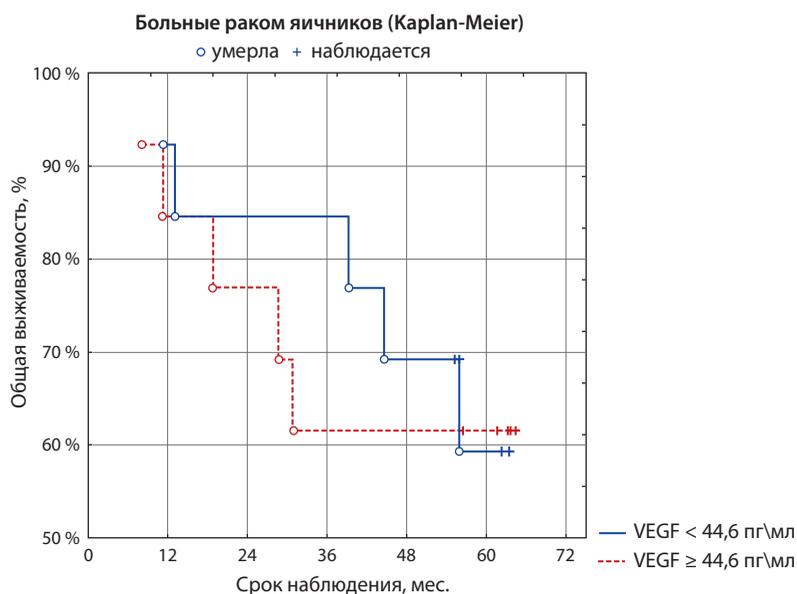


Рис. 1. Общая выживаемость больных РЯ с учетом медианы VEGF в плазме крови

В таблице 4 представлены результаты расчетов общей выживаемости больных РЯ в группах с различными сочетаниями показателей VEGF в плазме крови и уровнями метилирования 4 генов миРНК в опухоли.

Следует отметить, что заметно лучшая общая выживаемость выявлена в подгруппе из девяти больных РЯ с одновременно «низкими» концентрациями VEGF (< 44,6 пг/мл) в плазме крови и уровня метилирования гена

Таблица 3

Частота выявления различных сочетаний концентраций VEGF в плазме крови и уровня метилирования генов миРНК в опухоли больных РЯ

Ген миРНК в опухоли	Медиана метилирования	Частота сочетания выявления медианы концентраций VEGF и уровней метилирования генов миРНК Абс. (Отн.)			
		Оба низкие	VEGF высокий, ген миРНК низкий	VEGF низкий, ген миРНК высокий	Оба высокие
MIR124-2	42,0	9 (34,6 %)	4 (15,4 %)	4 (15,4 %)	9 (34,6 %)
MIR124-3	19,1	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)	7 (26,9 %)	6 (23,1 %)
MIR125B-1	38,1	8 (30,8 %)	5 (19,2 %)	5 (19,2 %)	8 (30,8 %)
MIR127	36,7	8 (30,8 %)	5 (19,2 %)	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)
MIR129-2	26,8	10 (38,5 %)	3 (11,5 %)	5 (19,2 %)	8 (30,8 %)
MIR132	15,1	7 (26,9 %)	6 (23,1 %)	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)
MIR137	16,9	7 (26,9 %)	6 (23,1 %)	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)
MIR203A	10,6	8 (30,8 %)	5 (19,2 %)	10 (38,5 %)	3 (11,5 %)
MIR34B	12,0	7 (26,9 %)	6 (23,1 %)	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)
MIR34C	12,6	8 (30,8 %)	5 (19,2 %)	7 (26,9 %)	6 (23,1 %)
MIR375	15,8	6 (23,1 %)	7 (26,9 %)	8 (30,8 %)	5 (19,2 %)
MIR9-1	9,2	5 (19,2 %)	8 (30,8 %)	3 (11,5 %)	10 (38,5 %)
MIR9-3	19,6	9 (34,6 %)	4 (15,4 %)	4 (15,4 %)	9 (34,6 %)
MIR339	11,4	8 (30,8 %)	5 (19,2 %)	5 (19,2 %)	8 (30,8 %)

Таблица 4

Общая выживаемость больных РЯ в зависимости от одновременно исследованных концентраций VEGF в плазме крови и уровня метилирования генов миРНК в опухоли

Сочетание показателей	N	Общая выживаемость, %		
		трехлетняя	четырёхлетняя	пятилетняя
VEGF < 44,6 и MIR124-2 < 42	9	88,9 ± 10,5	77,8 ± 13,9	64,8 ± 16,5
Все остальные	17	64,7 ± 11,6	58,8 ± 11,9	58,8 ± 11,9
Cox's F-Test p = 0,27				
VEGF < 44,6 и MIR125B-1 < 38	8	100	87,5 ± 11,7	72,9 ± 16,5
Все остальные	18	61,1 ± 11,5	55,6 ± 11,7	55,6 ± 11,7
Cox's F-Test p = 0,1				
VEGF < 44,6 и MIR129-2 < 27	10	90,0 ± 9,5	80,0 ± 12,6	66,7 ± 16,1
Все остальные	16	62,5 ± 12,1	56,3 ± 12,4	56,3 ± 12,1
Cox's F-Test p = 0,18				
VEGF < 44,6 и MIR375 < 16	6	100	83,3 ± 15,2	66,7 ± 19,2
Все остальные	20	65,0 ± 10,7	60,0 ± 11,0	60,0 ± 11,0
Cox's F-Test p = 0,25				

миРНК MIR124-2 (< 42) в опухоли. Показатель трехлетней общей выживаемости для этой группы пациенток составил 88,9 ± 10,5 %, четырехлетней — 77,8 ± 13,9 %, пятилетней — 64,8 ± 16,5 %.

В группе 17 больных РЯ со всеми «остальными» сочетаниями значений обоих маркеров (VEGF и MIR124-2) общая трехлетняя выжи-

ваемость составила 64,7 ± 11,6 %, четырехлетней — 58,8 ± 11,9 %, пятилетней — 58,8 ± 11,9 %, различия не были статистически значимы по сравнению с группой пациенток с одновременно «низкими» значениями исследованных маркеров (p = 0,27) (рис. 2). Однако следует указать, что трехлетняя общая выживаемость у больных РЯ при сочетании неблагоприятных

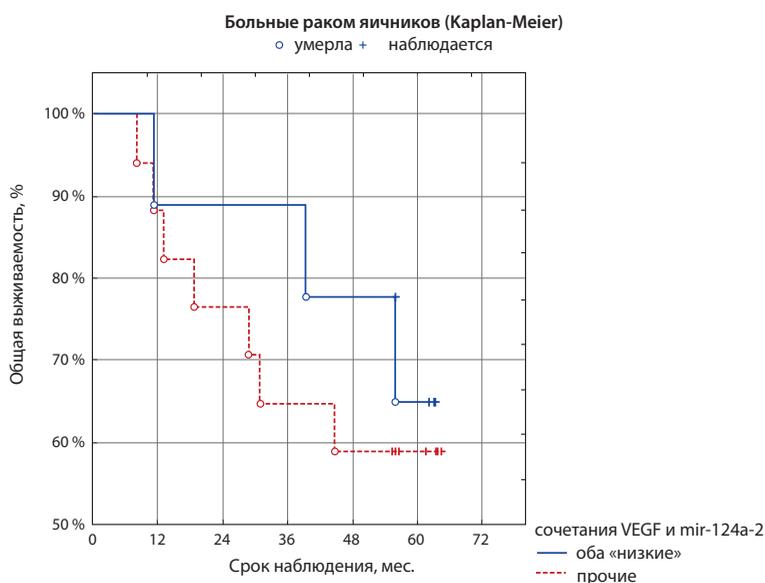


Рис. 2. Общая выживаемость больных РЯ с различными сочетаниями концентраций VEGF в плазме крови и уровня метилирования гена миРНК MIR124-2 в опухоли

«высоких» значений изученных маркеров снижалась на 24,2 % в сравнении с группой пациентов с «низкими» уровнями обоих маркеров VEGF и *MIR124-2*.

Еще более заметная тенденция к увеличению общей выживаемости ($p = 0,1$) выявлена нами у восьми больных РЯ при одновременном сочетании «низких» концентраций VEGF в плазме крови и уровней метилирования гена миРНК *MIR125B-1* в опухоли ($VEGF < 44,6$ пг/мл и $MIR125B-1 < 38,0$) (рис. 3): трехлетняя общая выживаемость в этой группе составила 100 %, четырехлетняя — $87,5 \pm 11,7$ %, пятилетняя — $72,9 \pm 16,5$ %. При всех других сочетаниях указанных маркеров общая выживаемость была сопоставима, поэтому эти больные были объединены в общую группу ($n = 18$), в которой показатель трехлетней общей выживаемости составил $61,1 \pm 11,5$ % (ниже на 39 %), четырехлетней — $55,6 \pm 11,7$ % (ниже на 31 %), пятилетней — $55,6 \pm 11,7$ % (ниже на 17 %).

При анализе отдаленных результатов лечения больных РЯ в группах с различными сочетаниями концентраций VEGF в плазме крови и уровня метилирования гена миРНК *MIR129-2* в ткани опухоли также наблюдали более высокую общую выживаемость в малочисленной группе из восьми больных с одновременно «низкими» показателями обоих маркеров ($VEGF < 44,6$ пг/мл и $MIR129-2 < 27$). При дру-

гих сочетаниях указанных маркеров выживаемость была сопоставима, поэтому больных объединили в общую группу. В этой группе были выделены пациентки с одновременно высокими значениями маркеров ($VEGF \geq 44,6$ пг/мл и $MIR129-2 \geq 27$), и показатели общей выживаемости при трехлетнем сроке наблюдения составили 27 %, четырехлетнем — 24 %, пятилетнем — 10 % ($p = 0,18$) (рис. 4).

При анализе отдаленных результатов лечения больных РЯ в группах с различными сочетаниями концентраций VEGF в плазме крови и уровнем метилирования гена миРНК *MIR375* в опухоли наблюдали более высокую общую выживаемость в группе из шести больных с одновременно «низкими» уровнями обоих маркеров ($VEGF < 44,6$ пг/мл и $MIR375 < 16$). При других сочетаниях указанных маркеров выживаемость была сопоставима, и больные были объединены в общую группу. Однако отметили различия в показателях общей выживаемости между этими двумя группами, которые при трехлетнем сроке наблюдения составили 35 %, при четырехлетнем — 23 %, при пятилетнем — 6 % ($p = 0,24$) (рис. 5).

Сочетания показателей VEGF в плазме крови с уровнем метилирования других генов миРНК не показали ассоциации с отдаленными результатами лечения, и эти данные не приводим.

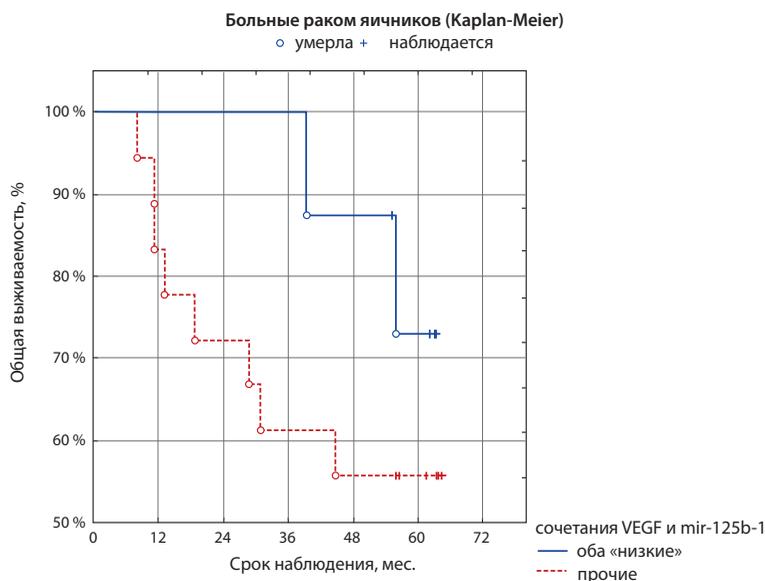


Рис. 3. Общая выживаемость больных РЯ с различными сочетаниями концентраций VEGF в плазме крови и уровня метилирования гена миРНК *MIR125B-1* в опухоли

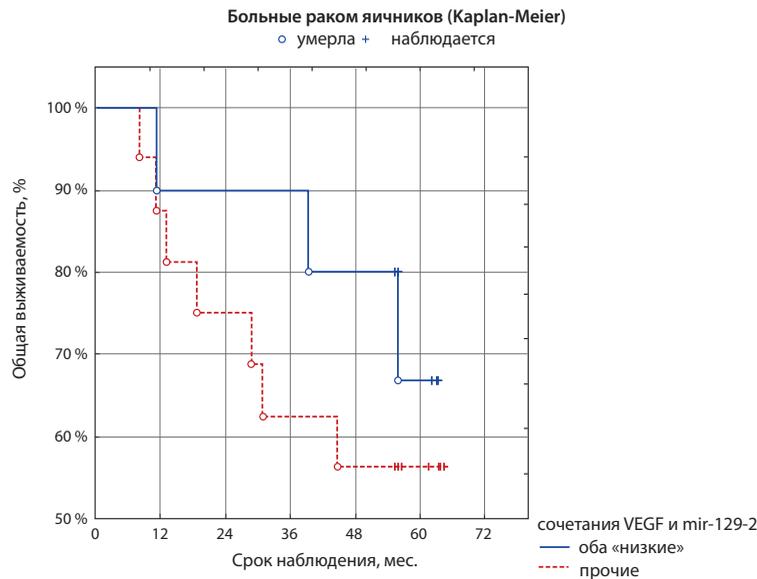


Рис. 4. Общая выживаемость больных РЯ с различными сочетаниями концентраций VEGF в плазме крови и уровней метилирования гена миРНК MIR129–2 в ткани опухоли

Выполненный многофакторный анализ (Proportional hazard (Cox) regression) связи общей выживаемости больных РЯ с учетом концентрации VEGF в плазме крови и уровня метилирования 4 генов миРНК в опухоли (MIR124–2, MIR125B-1, MIR129–2, MIR375) показал, что последние влияют на отдаленные результаты лечения больных РЯ в большей степени, чем VEGF. Так, показатель трехлетней общей выживаемости 13 больных РЯ при благоприятных

«низких» уровнях VEGF < 44,6 пг/мл в плазме крови пациенток равнялся $84,6 \pm 10,0$ %, четырехлетней — $69,2 \pm 12,8$ %, пятилетней — $59,3 \pm 14,3$ %. Показатели общей выживаемости 13 пациенток с неблагоприятными «высокими» значениями VEGF $\geq 44,6$ пг/мл при трехлетнем сроке наблюдения составили 23,5 %, четырехлетнем — 7,7 %, пятилетнем — отсутствовали.

В то же время при разделении больных РЯ с благоприятными «низкими» значениями

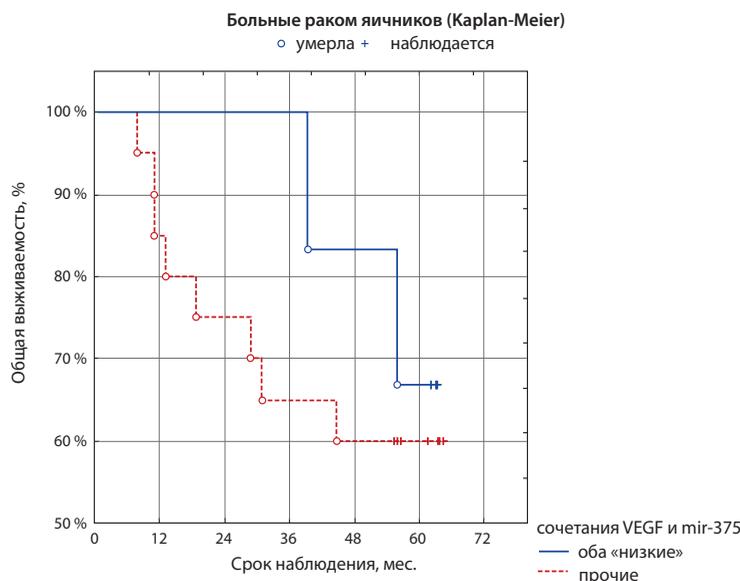


Рис. 5. Общая выживаемость больных РЯ с различными сочетаниями концентраций VEGF в сыворотке крови и уровнем метилирования гена миРНК MIR375 в опухоли

VEGF < 44,6 пг/мл на подгруппы с «низкими» и «высокими» уровнями метилирования гена миРНК *MIR125B-1* в опухоли по порогу 38 показатели трехлетней общей выживаемости составили соответственно 100 % и 60,0 ± 21,9 %, четырехлетней — 87,5 ± 11,7 % и 40,0 ± 21,9 %, пятилетней — 72,9 ± 16,5 % и 40,0 ± 21,9 %, то есть на протяжении всего срока наблюдения выживаемость различалась на 32–40 %.

У больных с «высокими» концентрациями VEGF ≥ 44,6 пг/мл в плазме крови при разделении на «низкие» и «высокие» уровни метилирования гена миРНК *MIR125B-1* в опухоли незначительно менялись общие показатели выживаемости пациенток, которые составили 60,0 ± 21,9 % и 62,5 ± 17,1 % соответственно.

Как было указано рядом авторов, развитие РЯ имеет выраженную зависимость от ангиогенеза, который играет важную роль в обеспечении роста и распространения раковых клеток и связан с мобилизацией системы различных ростовых факторов [22], среди которых белки семейства VEGF/VEGFR, известные как «сосудистые факторы проницаемости», играют ключевую роль в этом процессе [23]. Показано, что в ответ на гипоксию опухоль начинает вырабатывать миРНК, поддерживающие устойчивый рост опухоли и ангиогенез, и подавляет ее выработку миРНК с противоположным действием [16]. Так, повышается концентрация miR-27a, мишенью которой является ZBTB10 (Zinc Finger And BTB Domain-Containing Protein 10), за счет чего косвенно регулируются VEGF и VEGFR. В то же время экспрессия miR-16, miR-15b, miR-20a и miR-20b, репрессирующих ангиогенез за счет подавления VEGF и VEGFR, в опухоли снижена [14]. Показано, что miR-145 ингибирует синтез HIF1-β и VEGF за счет действия на мишень p70S6K1, а miR-125b и miR-199a прямо действуют на HIF1-β и VEGF. Также мишенями miR-199a являются HIF1-β, и HIF2-β.

Анализ опухолей разного происхождения позволил идентифицировать группы миРНК, непосредственно взаимодействующие с 3'-регионом мРНК VEGF, при этом было обнаружено влияние некоторых миРНК на систему VEGF/VEGFR при посредничестве ряда сиг-

нальных белков. Так, выявлено, что гиперэкспрессия некоторых миРНК, в частности miR-495, ингибирует PI3K/Akt и митоген-активируемые протеинкиназы/внеклеточные пути сигнально-регулируемых киназ (MAPK/ERK), что приводит к ингибированию экспрессии VEGFA и ангиогенеза [24].

Новым подходом к определению роли миРНК послужил анализ ее эпигенетической регуляции, в частности посредством изменения статуса метилирования промоторных CpG-островков, что вносит значительный вклад в регуляцию экспрессии генов, кодирующих белки. Предполагается, что доля генов миРНК, регулируемых посредством метилирования CpG-островков, в 5–10 раз выше, чем структурных генов. Метилирование, подавляя экспрессию генов миРНК, снижает их функциональную активность в отношении генов-мишеней, в том числе онкогенов и генов прогрессии опухолей. В то же время исследования системы VEGF/VEGFR при РЯ и его связь с прогнозом развития заболевания показали противоречивые результаты [25, 26]. В связи с этим в настоящее время актуален анализ механизмов и факторов, способных влиять на систему ангиогенеза при РЯ, среди которых важную роль могут играть миРНК, ингибирующие экспрессию генов на посттранскрипционном уровне.

В представленном нами исследовании определена новая группа генов миРНК (*MIR124-2*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR375*), метилирование которых в опухоли совместно с изменением концентрации VEGF плазмы крови оказывают значимое влияние на прогноз выживаемости больных серозным РЯ. Ранее для ключевого супрессора *MIR124* показана значимая связь с выживаемостью при раке печени [27, 28], однако данные о влиянии *MIR124* и тем более метилирования гена *MIR124-2* на выживаемость больных РЯ не сообщались. Есть работы, в которых показано влияние *MIR125A/B* на выживаемость больных раком желудка [29], однако данных о связи этой миРНК с выживаемостью больных РЯ не выявлено. Имеются данные о влиянии miR-129 на общую выживаемость больных раком простаты [30], однако связь miR-129 или

метилирования гена *MIR129-2* с выживаемостью больных РЯ не была изучена ранее. В то же время полученные нами данные согласуются с влиянием на общую выживаемость больных РЯ снижением экспрессии *MIR375* под воздействием онкогенной длинной нкРНК LINC00662 [31]. Интересно отметить недавнее сообщение об анализе совместного воздействия VEGF и миРНК (*MIR126*) на патогенез и выживаемость больных эндометриоидной карциномой по цепочке MCM3AP-AS1/*MIR126*/VEGF; хотя в этой работе все измерения были выполнены в тканях больных [32].

Заключение

Таким образом, в данной работе впервые провели анализ связи уровня метилирования

14 генов миРНК в опухоли с концентрациями VEGF в плазме крови 26 первичных, ранее не леченных больных серозным РЯ и показали, что совместное определение VEGF в плазме крови с уровнями метилирования 4 генов миРНК (*MIR124-2*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR-375*) в опухоли позволяет в определенной степени уточнить прогноз заболевания у больных РЯ. Представленные к настоящему времени в литературе дискуссии о молекулярных механизмах метастазирования РЯ, идентифицированные регуляторные миРНК и их мишени уже находят применение при выборе маркеров в оценке прогноза метастазирования и лекарственной резистентности опухоли, а также в будущем для выбора новых мишеней целенаправленной терапии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Djebali S., Davis C. A., Merkel A., Dobin A., Lassmann T., Mortazavi A., Tanzer A., et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012; 489(7414): 101–108.
2. Zhao L., Liang X., Wang L., Zhang X. The Role of miRNA in Ovarian Cancer: an Overview. *Reprod. Sci.* 2022; 29(10): 2760–2767.
3. Graves P., Zeng Y. Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2012; 10(5): 239–245.
4. Gerstein M. B., Kundaje A., Hariharan M., Landt S. G., Yan K. K., Cheng C., et al. *Nature*. 2012; 489(7414): 91–100.
5. Katz B., Tropé C. G., Reich R., Davidson B. MicroRNAs in Ovarian Cancer. *Hum Pathol*. 2015; 46(9): 1245–1256.
6. Cora' D., Re A., Caselle M., Bussolino F. MicroRNA-mediated regulatory circuits: outlook and perspectives. *Phys. Biol*. 2017; 14(4): 045001.
7. Ribatti D. Immunosuppressive effects of vascular endothelial growth factor. *Oncol. Lett.* 2022; 24(4): 369.
8. Saburi A., Kahrizi M. S., Naghsh N., Etemadi H., İlhan A., Adili A., et al. A comprehensive survey into the role of microRNAs in ovarian cancer chemoresistance; an updated overview. *J. Ovarian Res.* 2022; 15(1): 81.
9. Loginov V. I., Pronina I. V., Filippova E. A., Burdennyi A. M., Lukina S. S., Kazubskaya, T. P., Uroshlev L. A., et al. Aberrant Methylation of 20 miRNA Genes Specifically Involved in Various Steps of Ovarian Carcinoma Spread: From Primary Tumors to Peritoneal Macroscopic Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(3): 1300.
10. Reddy K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int.* 2015; 15: e: 38.
11. Ergun S., Oztuzcu S. Oncocers: ceRNA-mediated cross-talk by sponging miRNAs in oncogenic pathways. *Tumour Biol.* 2015; 36(5): 3129–3136.
12. Koshiyama M., Matsumura N., Konishi I. Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel)*. 2017; 7(1): E12.
13. Kinose Y., Sawada K., Nakamura K., Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 249393.
14. Wang Y., Kim S., Kim I. M. Regulation of metastasis by microRNAs in ovarian cancer. *Front Oncol.* 2014; 4: 143.
15. Chan S. H., Wang L. H. Regulation of cancer metastasis by microRNAs. *J. Biomed. Sci.* 2015; 22: 9.
16. Cuzziol C. I., Castanhole-Nunes M. M.U., Pavarino É.C., Goloni-Bertollo E. M. MicroRNAs as regulators of VEGFA and NFE2L2 in cancer. *Gene*. 2020; 759: 144994.
17. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Eds Kurman R. J., Carcangiu M. L., Herrington C. S., Young R. H., 4th edition. Lyon, IARC. 2014.
18. Loginov V. I., Pronina I. V., Burdennyi A. M., Filippova E. A., Kazubskaya T. P., Kushlinsky D. N., et al. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene*. 2018; 662: 28–36.

19. Hattermann K., Mehdorn H. M., Rolf Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal. Biochem.* 2008; 377(1): 62–71.
20. Panagopoulou M., Karaglani M., Balgouranidou I., Biziota E., Koukaki T., Karamitrousis E., et al. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers. *Oncogene.* 2019; 38(18): 3387–3401.
21. Braga E. A., Loginov V. I., Burdennyi A. M., Filippova E. A., Pronina I. V., Kurevlev S. V., Kazubskaya T. P., Kushlinskii D. N., Utkin D. O., Ermilova V. D., Kushlinskii N. E. Five hypermethylated microRNA genes as potential markers of ovarian cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 164(3): 351–355.
22. Crawford J., Ferrara N. VEGF inhibition: findings from preclinical and clinical studies. *Cell. Tissue Res.* 2009; 335(1): 261–269.
23. Taraboletti D. G., Patton V., Alzani R., Perego P., Fruscio R., Jürgensmeier J. M., et al. Vascular endothelial growth factor contributes to the progression of ovarian carcinoma through paracrine and autocrine mechanisms // *Am. J. Pathol.* 2014; 184(4): 1050–1061.
24. Wang W., Ren F., Wu Q., Jiang D., Li H., Shi H. MicroRNA-497 suppresses angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor A through the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 2014; 32(5): 2127–2133.
25. Hata K., Watanabe Y., Nakai H., Hata T., Hoshiai H. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene in epithelial ovarian cancer: an approach to anti-VEGF therapy // *Anticancer Res.* 2011; 31(2): 731–738.
26. Ledermann J. A., Marth C., Carey M. S., Birrer M., Bowtell D. D., Kaye S., et al. Role of molecular agents and targeted therapy in clinical trials for women with ovarian cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2011. Vol. 21. P. 763–770.
27. Long H. D., Ma Y. S., Yang H. Q., Xue S. B., Liu J. B., Yu F., et al. Reduced hsa-miR-124-3p levels are associated with the poor survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* 2018; 45(6): 2615–2623.
28. Braga E. A., Fridman M. V., Burdennyi A. M., Filippova E. A., Loginov V. I., Pronina I. V., et al. Regulation of the Key Epithelial Cancer Suppressor miR-124 Function by Competing Endogenous RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(21): 13620.
29. Amiri-Dashatan N., Koushki M., Naghi-Zadeh M., Razzaghi M. R., Mohaghegh Shalmani H. Prognostic value of microRNA-125a/b family in patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* 2021; 14(Suppl. 1): S1–S9.
30. Hu Z., Guo J., Zhao M., Jiang T., Yang X. Predictive values of miR-129 and miR-139 for efficacy on patients with prostate cancer after chemotherapy and prognostic correlation. *Oncol. Lett.* 2019; 18(6): 6187–6195.
31. Tao L. M., Gong Y. F., Yang H. M., Pei J. H., Zhao X. J., Liu S. S. LINC00662 promotes glycolysis and cell survival by regulating miR-375/HIF-1 α axis in ovarian cancer. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2020; 34(3): 467–477.
32. Yu J., Fan Q., Li L. The MCM3AP-AS1/miR-126/VEGF axis regulates cancer cell invasion and migration in endometrioid carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 2021; 19(1): 213.

АВТОРЫ

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»; Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложных наследственных заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский центр медицинской генетики имени академика Н. П. Бочкова»; Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, 1; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>; электронная почта: loginov7w@gmail.com

Loginov Vitaliy I., Ph.D. in Biological Sciences, Leading Research Associate of the Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics of Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology”; Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8; Leading Research Associate of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Disorders of Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Center for Medical Genetics named after academician N. P.Bochkov”; Russia, 115522, Moscow, Moskvorechye st., 1; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>; e-mail: loginov7w@gmail.com

Плиева Яна Зурабовна, аспирантка заочного отделения лаборатории клинической биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1191-111X>; электронная почта: yana-plieva@mail.ru

Pliyeva Yana Z, External Ph.D. Student of the Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1191-111X>; e-mail: yana-plieva@mail.ru

Алферов Александр Андреевич, доктор медицинских наук, кандидат медицинских наук, врач отделения клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 11552, Москва, Каширское шоссе, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>; электронная почта: aleksandr.alferov@yahoo.com

Alferov Aleksandr A., M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Physician of Clinical Laboratory Diagnostics of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 11552, Moscow, Kashirskoye highway, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>; e-mail: aleksandr.alferov@yahoo.com

Колтунова Анна Игоревна, доктор медицинских наук, патологоанатом отделения морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8948-7764>; электронная почта: annykoltunova.pretty@yahoo.com

Koltunova Anna I., M. D., Pathologist of the Division of Morphological and Molecular — Genetic Diagnosis of Tumors of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8948-7764>; e-mail: annykoltunova.pretty@yahoo.com

Вашкетова Ольга Ивановна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; <https://orcid.org/0000-0003-3387-6634>; электронная почта: ok_olga@mail.ru

Vashketova Olga I., Ph.D. in Medical Sciences, Senior Research Associate of the Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; <https://orcid.org/0000-0003-3387-6634>; e-mail: ok_olga@mail.ru

Кушлинский Дмитрий Николаевич, кандидат медицинских наук, зав. отделением онкогинекологии, КГБУЗ МЗ Хабаровский краевой клинический центр онкологии; 680042, г. Хабаровск, Воронежское шоссе, 164

Kushlinskiy Dmitriy N., M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Chief of Department of Gynecologic Oncology, Regional State Budgetary Healthcare Institution Khabarovsk Regional Clinical Center of Oncology. 680042, Khabarovsk, Voronezhskoye highway, 164.

Паяниди Юлия Геннадьевна, доктор медицинских наук, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения хирургии №8 (гинекологическая онкология) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский онкологический центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; электронная почта: paian-u@yandex.ru

Payanidi Yulia G., M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Senior Research Associate of Department of Surgery №8 (Gynecologic Oncology) of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; e-mail: paian-u@yandex.ru

Рогожин Дмитрий Викторович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>; электронная почта: pathol.777@mail.ru

Rogozhin Dmitriy V., Ph.D. in Medical Sciences, Head of Division of Morphological and Molecular — Genetic Diagnosis of Tumors of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0777-9152>; e-mail: pathol.777@mail.ru

Жордания Кирилл Иосифович, доктор медицинских наук, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения хирургии № 8 (гинекологическая онкология) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский онкологический центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; электронная почта: kiazo2@yandex.ru

Zhordania Kirill I., M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Leading Research Associate of Department of Surgery №8 (Gynecologic Oncology) of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; e-mail: kiazo2@yandex.ru

Шевчук Алексей Сергеевич, доктор медицинских наук, кандидат медицинских наук, заведующий отделением хирургии № 8 (гинекологическая онкология) Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 24; электронная почта: oncogyn@live.ru

Shevchyuk Aleksey S., M. D., Ph.D. in Medical Sciences, Chief of Department of Surgery №8 (Gynecologic Oncology) of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; e-mail: oncogyn@live.ru

Бурденный Алексей Михайлович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; электронная почта: burdennyu@gmail.com

Burdennyi Aleksey M., Ph.D. in Biological Sciences, Leading Research Associate of the Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics of Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology”; Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8; e-mail: burdennyu@gmail.com

Брага Элеонора Александровна, кандидат биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики сложных наследственных заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский центр медицинской генетики имени академика Н. П. Бочкова»; Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, 1; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>; электронная почта: eleonora10_45@mail.ru

Braga Eleonora A., Ph.D. in Biological Sciences, Professor, Leading Research Associate, Head of the Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics of Federal State Budgetary Scientific Institution “Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology”; Russia, 125315, Moscow, Baltiyskaya street, 8; Leading Research Associate of the Laboratory of Molecular Genetics of Molecular Genetics of Complex Inherited Disorders of Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Center for Medical Genetics named after academician N. P.Bochkov”; Russia, 115522, Moscow, Moskvorechye st., 1; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>; e-mail: eleonora10_45@mail.ru

Кушлинский Николай Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, заведующий лабораторией клинической биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе шоссе, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>; электронная почта: biochimia@yandex.ru

Kushlinskiy Nikolay E., Ph.D. in Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry of Federal State Budgetary Institution “N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; Russia, 115522, Moscow, Kashirskoye highway, 24; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>; e-mail: biochimia@yandex.ru