



**New Day in Medicine**  
**Новый День в Медицине**

**NDM**



# TIBBIYOTDA YANGI KUN

Ilmiy referativ, marifiy-ma'naviy jurnal



**AVICENNA-MED.UZ**



ISSN 2181-712X.  
EiSSN 2181-2187

**3 (77) 2025**

**Сопредседатели редакционной  
коллегии:**

**Ш. Ж. ТЕШАЕВ,  
А. Ш. РЕВИШВИЛИ**

Ред. коллегия:

М.И. АБДУЛЛАЕВ  
А.А. АБДУМАЖИДОВ  
Р.Б. АБДУЛЛАЕВ  
Л.М. АБДУЛЛАЕВА  
А.Ш. АБДУМАЖИДОВ  
М.А. АБДУЛЛАЕВА  
Х.А. АБДУМАЖИДОВ  
Б.З. АБДУСАМАТОВ  
М.М. АКБАРОВ  
Х.А. АКИЛОВ  
М.М. АЛИЕВ  
С.Ж. АМИНОВ  
Ш.Э. АМОНОВ  
Ш.М. АХМЕДОВ  
Ю.М. АХМЕДОВ  
С.М. АХМЕДОВА  
Т.А. АСКАРОВ  
М.А. АРТИКОВА  
Ж.Б. БЕКНАЗАРОВ (главный редактор)  
Е.А. БЕРДИЕВ  
Б.Т. БУЗРУКОВ  
Р.К. ДАДАБАЕВА  
М.Н. ДАМИНОВА  
К.А. ДЕХКОНОВ  
Э.С. ДЖУМАБАЕВ  
А.А. ДЖАЛИЛОВ  
Н.Н. ЗОЛотова  
А.Ш. ИНОЯТОВ  
С. ИНДАМИНОВ  
А.И. ИСКАНДАРОВ  
А.С. ИЛЬЯСОВ  
Э.Э. КОБИЛОВ  
А.М. МАННАНОВ  
Д.М. МУСАЕВА  
Т.С. МУСАЕВ  
М.Р. МИРЗОЕВА  
Ф.Г. НАЗИРОВ  
Н.А. НУРАЛИЕВА  
Ф.С. ОРИПОВ  
Б.Т. РАХИМОВ  
Х.А. РАСУЛОВ  
Ш.И. РУЗИЕВ  
С.А. РУЗИБОВЕВ  
С.А.ГАФФОРОВ  
С.Т. ШАТМАНОВ (Кыргызстан)  
Ж.Б. САТТАРОВ  
Б.Б. САФОВЕВ (отв. редактор)  
И.А. САТИВАЛДИЕВА  
Ш.Т. САЛИМОВ  
Д.И. ТУКСАНОВА  
М.М. ТАДЖИЕВ  
А.Ж. ХАМРАЕВ  
Д.А. ХАСАНОВА  
А.М. ШАМСИЕВ  
А.К. ШАДМАНОВ  
Н.Ж. ЭРМАТОВ  
Б.Б. ЕРГАШЕВ  
Н.Ш. ЕРГАШЕВ  
И.Р. ЮЛДАШЕВ  
Д.Х. ЮЛДАШЕВА  
А.С. ЮСУПОВ  
Ш.Ш. ЯРИКУЛОВ  
М.Ш. ХАКИМОВ  
Д.О. ИВАНОВ (Россия)  
К.А. ЕГЕЗАРЯН (Россия)  
DONG JINCHENG (Китай)  
КУЗАКОВ В.Е. (Россия)  
Я. МЕЙЕРНИК (Словакия)  
В.А. МИТИШ (Россия)  
В.И. ПРИМАКОВ (Беларусь)  
О.В. ПЕШИКОВ (Россия)  
А.А. ПОТАПОВ (Россия)  
А.А. ТЕПЛОВ (Россия)  
Т.Ш. ШАРМАНОВ (Казахстан)  
А.А. ЩЕГОЛОВ (Россия)  
С.Н. ГУСЕЙНОВА (Азербайджан)  
Prof. Dr. KURBANHAN MUSLUMOV (Azerbaijan)  
Prof. Dr. DENIZ UYAK (Germany)

**ТИББИЁТДА ЯНГИ КУН  
НОВЫЙ ДЕНЬ В МЕДИЦИНЕ  
NEW DAY IN MEDICINE**

*Илмий-рефератив, маънавий-маърифий журнал  
Научно-реферативный,  
духовно-просветительский журнал*

**УЧРЕДИТЕЛИ:**

**БУХАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ  
ООО «ТИББИЁТДА ЯНГИ КУН»**

Национальный медицинский  
исследовательский центр хирургии имени  
А.В. Вишневского является генеральным  
научно-практическим  
консультантом редакции

Журнал был включен в список журнальных  
изданий, рецензируемых Высшей  
Аттестационной Комиссией  
Республики Узбекистан  
(Протокол № 201/03 от 30.12.2013 г.)

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

М.М. АБДУРАХМАНОВ (Бухара)  
Г.Ж. ЖАРЫЛКАСЫНОВА (Бухара)  
А.Ш. ИНОЯТОВ (Ташкент)  
Г.А. ИХТИЁРОВА (Бухара)  
Ш.И. КАРИМОВ (Ташкент)  
У.К. КАЮМОВ (Тошкент)  
Ш.И. НАВРУЗОВА (Бухара)  
А.А. НОСИРОВ (Ташкент)  
А.Р. ОБЛОКУЛОВ (Бухара)  
Б.Т. ОДИЛОВА (Ташкент)  
Ш.Т. УРАКОВ (Бухара)

**3 (77)**

**2025**

*март*

www.bsmi.uz

https://newdaymedicine.com E:

ndmuz@mail.ru

Тел: +99890 8061882

УДК 618.19-006.6-07-08:577.21

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ МИКРОРНК В РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1,2</sup>Жуманиёзов Х.И. <https://orcid.org/0000-0003-1185-9016> E-mail: [dr.oncohikmat@inbox.ru](mailto:dr.oncohikmat@inbox.ru)

<sup>1,2</sup>Хакимова Г.Г. <https://orcid.org/0000-0002-4970-5429> E-mail: [hgg\\_doc@mail.ru](mailto:hgg_doc@mail.ru)

<sup>1,2</sup>Талипов О.А. <http://orcid.org/0009-0000-4712-9600> e-mail: [orifjon1986@mail.ru](mailto:orifjon1986@mail.ru)

<sup>1</sup>Салохиддинов Х.А. <http://orcid.org/0009-0007-6236-1951>

<sup>1</sup>Ташкентский педиатрический медицинский институт, 100140, Узбекистан Ташкент, ул. Богишамол, 223, тел: 8 71 260 36 58 E.mail: [interdep@tashpmi.uz](mailto:interdep@tashpmi.uz)

<sup>2</sup>Ташкентский городской филиал Республиканского специализированного научно-практического центра онкологии и радиологии 100070, Республики Узбекистан, город Ташкент Чиланзарский район, ул. Багистан, дом 1 Тел: (+998) 71 278-73-19

E-mail: [qabul@tashoncocenter.uz](mailto:qabul@tashoncocenter.uz)

### ✓ Резюме

*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 рака молочной железы (РМЖ), в возрасте от 30 до 72 лет. Преобладали больные со II (51,4%) и III (31,4%) стадией. Метастазы в лимфатические лимфоузлы наблюдались в 60%. 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%) РМЖ был умеренной дифференцировки, в 21,4% случаев отмечена низкая дифференцировка и только 4,4% пациентов имели высокодифференцированную 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 — в 14,2% и нелюминальный Her2 (+) позитивный подтип – в 7,1% случаев. Методом метил-специфичной полимеразной цепной реакцией (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 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 miR демонстрировали повышенные уровни метилирования CpG-островков промоторных областей, что свидетельствует о 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 miR.

**Ключевые слова:** сравнительный анализ, метилирования генов микроРНК в различных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы, люминальные В Her2-негативным подтипом РМЖ.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF MICRORNA GENE METHYLATION IN VARIOUS MOLECULAR BIOLOGICAL SUBTYPES OF BREAST CANCER

<sup>1,2</sup>Jumaniyozov H.I. <https://orcid.org/0000-0003-1185-9016> E-mail: [dr.oncohikmat@inbox.ru](mailto:dr.oncohikmat@inbox.ru)

<sup>1,2</sup>Xakimova G.G. <https://orcid.org/0000-0002-4970-5429> E-mail: [hgg\\_doc@mail.ru](mailto:hgg_doc@mail.ru)

<sup>1,2</sup>Talipov O.A. <http://orcid.org/0009-0000-4712-9600> e-mail: [orifjon1986@mail.ru](mailto:orifjon1986@mail.ru)

<sup>1</sup>Salohiddinov H.A. <http://orcid.org/0009-0007-6236-1951>

<sup>1</sup>Tashkent Pediatric Medical Institute, Uzbekistan 100140, Tashkent, 223 Bogishamol St, tel: 8 71 260 36 58 E.mail: [interdep@tashpmi.uz](mailto:interdep@tashpmi.uz)

<sup>2</sup>Tashkent city branch of the Republican specialized scientific and practical center of oncology and radiology 100070, Republic of Uzbekistan, Tashkent city Chilanzar district, BAGISTAN street, house 1 Tel: (+998) 71 278-73-19 E-mail: [qabul@tashoncocenter.uz](mailto:qabul@tashoncocenter.uz)

### ✓ Resume

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

**Materials and methods.** 70 patients are included in research with a verified diagnosis of breast cancer in the age from 30 to 72 years. Patients with stage II (51.4%) and III (31.4%) are prevailed. Metastases to the lymph nodes were observed in 60%. Invasive ductal carcinoma was detected in 72.8% of cases, invasive lobular carcinoma - 12.8% of cases, other forms of cancer were diagnosed in 14.4% of patients. Moderately differentiated breast cancer was in the majority of patients (74.2%), in 21.4% of cases there was low differentiation, 4.4% of patients had a well-differentiated tumor. Luminal subtype A was found in 27.1% of patients; luminal subtype B Her2-negative - in 18.5% of patients; in 32.8% of cases - luminal subtype B Her2-positive, thrice-negative - in 14.2% and non-luminal Her2 (+) positive subtype - in 7.1% of cases. Methyl-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) was used to study the methylation profile of microRNA genes (miR-107, -124a-1/2/3, -125b-1, -127, -130b, -137, -203a, -375) in paired images of tumor and histologically unchanged breast tissue. The results were processed with the standard packages STATISTICA, v. 10 and IBM SPSS Statistics, v. 21.

**Results.** It was found that in luminal A subtype breast cancer the frequency of miR-124a-1 and miR-125b-1 methylation in tumor tissue increased by 2.3 (84.2% (n = 16) versus 36.8% (n = 7), p = 0.0069) and 8 times (42.1% (n = 8) versus 15.8% (n = 1), p = 0.0189) respectively in comparison with unchanged breast tissue.

At Her2-negative and at Her2-positive luminalny In a subtype reliable differences in the frequency of methylation of genes of microrNA miR-124a-1, miR-375 in a tumor and histologically are shown to not changed fabric. The methylation rate of these microRNAs at Her2-positive subtype was 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 as follows: 84.6% (11/13) versus 38.4% (5/13), (p = 0.01) and 69.2% (9/13) versus 23% (3/13), (p = 0.01), respectively.

A high methylation frequency of miR-124a-3 and miR-125b-1 was established at the Her2-positive B subtype of CMW.

At the triple-negative subtype, methylation of miR-125b-1 in tumor tissue was observed in most samples (70% (n = 7), p = 0.0075), and was absent in histologically unchanged tissue.

**Conclusion:** All studied miRs demonstrated increased levels of methylation of the CpG islands of the promoter regions which indicates their potential diagnostic value. The frequency of miR-375 methylation was significantly increased in tumors in the triple-negative subtype in comparison with the luminal B Her2-negative BC subtype. For the Her2-positive luminal B subtype was noted a high percentage of 6 miR methylation.

**Key words:** Comparative analysis of microRNA gene methylation in different molecular biological subtypes of breast cancer, luminal B Her2-negative subtype of breast cancer.

### Актуальность

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 раннего выявления РМЖ, а также с естественным увеличением “женского генофонда” и, как следствие, с увеличением количества больных [2].

Лечение РМЖ представляет 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 эндогенной 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, и в том числе при РМЖ [5; 6; 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 её 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].

**Цель:** изучение роли метилирования генов микроРНК (*miR-107*, *-124a-1/2/3*, *-125b-1*, *-127*, *-130b*, *-137*, *-203a*, *-375*) в различных подтипах РМЖ.

### Материал и методы

Работа основана на анализе ретроспективных данных комплексного обследования и лечения 70 больных РМЖ, получавших лечение в НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина с 2004 по 2017 гг. Распределение больных в зависимости от возраста, стадии заболевания и гистологического вида РМЖ представлена в таблице 1. Медиана возраста больных составила 54 года. Большинство составили пациентки от 40 до 60 лет. В исследовании преобладали пациентки со II (51,4%) и III (31,4%) стадией заболевания. Диагноз был верифицирован гистологически и иммуногистохимически. У 51 (72,8%) пациентов выявлен инвазивный протоковый рак, у 9 (12,8%) пациентов инвазивный дольковый рак, у 4 (5,7%) пациентов смешанный рак и у 6 (8,6%) пациентов редкие формы рака молочной железы. У 42 (60%) пациенток выявлено метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов. Из 70 пациентов у 52 (74,2%) наблюдалась G2, у 15 (21,4%) пациентов G3 и только у 3 (4,4%) пациентов G1. На рисунке 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.

**Таблица 1 - 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%)
IIб	16 (22,8%)
IIIa	16 (22,8%)
IIIб	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. Брага Э.А.)

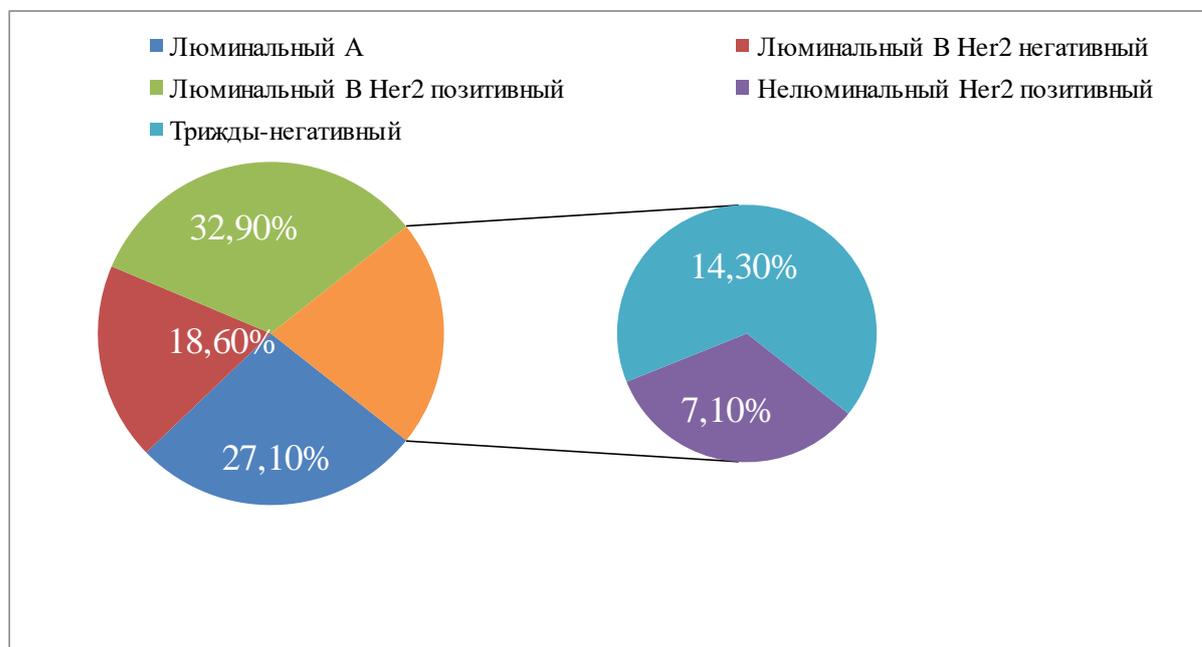
Оценка метилирования CpG-районов промоторных областей генов miR-107, -124a-1/2/3, -125b-1, -127, -130b, -137, -203a, -375 проводилась методом метил-специфичной ПЦР. Метод основан на бисульфитной конверсии ДНК. Это возможно благодаря способности молекулы гидросульфита взаимодействовать с цитозином в составе 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 трех до шести CpG-динуклеотидов для каждого гена.

Для статистической обработки результатов проведенного исследования все данные 70 больных РМЖ сформированы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в «базу данных», созданную на основе электронных таблиц EXCEL v. 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  $\chi^2$  (Хи-квадрат). Различия считали значимыми при

$p < 0,05$  (точность  $\geq 95\%$ ), также использовалась маргинальная значимость ( $0,05 < p < 0,1$ ) для обозначения тенденции.

**Рисунок 1 - Распределение больных по молекулярно-биологическим подтипам РМЖ**



### Результат 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 таблице 2. По результатам сравнения установлено, что частота метилирования *miR-375* достоверно снижается в опухоли 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 так же 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 *miR* касались только *miR-375*. Это было выявлено в отношении трижды-негативного подтипа в сравнении с люминальным В Her2-негативным. Однако утверждать, что определение частоты метилирования этой *miR* с целью разграничения этих двух подтипов по фактору прогноза будет целесообразно, с нашей точки зрения преждевременно. По нашим данным, метилирование *miR-375* при трижды-негативном раке выявляется нередко - в 20% случаев. Поэтому, мы не можем однозначно утверждать, что метилирование данной *miR* 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 изучение метилирования *miR* в опухоли и гистологически неизменной ткани при каждом подтипе РМЖ.

#### **Люминальный А подтип РМЖ**

Нами выполнено сравнение частоты метилирования в образцах опухолевой и неизменной ткани молочной железы при люминальным А подтипе РМЖ. Полученные в ходе анализа

данные представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка, при данном 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, что отмечено при ряде опухолей, включая РМЖ. [9; 10; 11]. В эксперименте установлено, что инактивация генов супрессорных *miR*, к которым относится и *miR-124a*, сопряжено с прогрессированием опухолевого процесса.

**Таблица 2 - Частота метилирования микроРНК в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ**

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

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

\*\*Люминаль-ный А подтип /люминаль-ный В Her2-позитивный подтип ( $0.1 > p > 0.05$ )

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* Wang, S. с соавт. в своем исследовании продемонстрировали, что данная *miR*, подавляя экспрессию целевых генов *ERBB2* и *ERBB3*, играет супрессорную роль [12]. Снижение экспрессии *miR-125b* было показано Nie, J. и соавт. при метастазирующем РМЖ [13]. Оказалось, что данный факт связан с гиперметилированием промоторного CpG-островка *miR-125b-1* [14; 15]. Таким образом, гиперметилирование данной *miR* - ассоциируется с активным ростом опухоли.

Резюмируя данный раздел работы, мы отметили, что при люминальном А подтипе РМЖ гиперметилирование *miR* в опухолевой ткани выявлено в отношении двух видов: *miR-124a-1* и *miR-125b-1*. Полученные нами результаты о высокой частоте метилирования указанных *miR* при РМЖ подтверждают данные мировой литературы [9; 10; 11; 13].

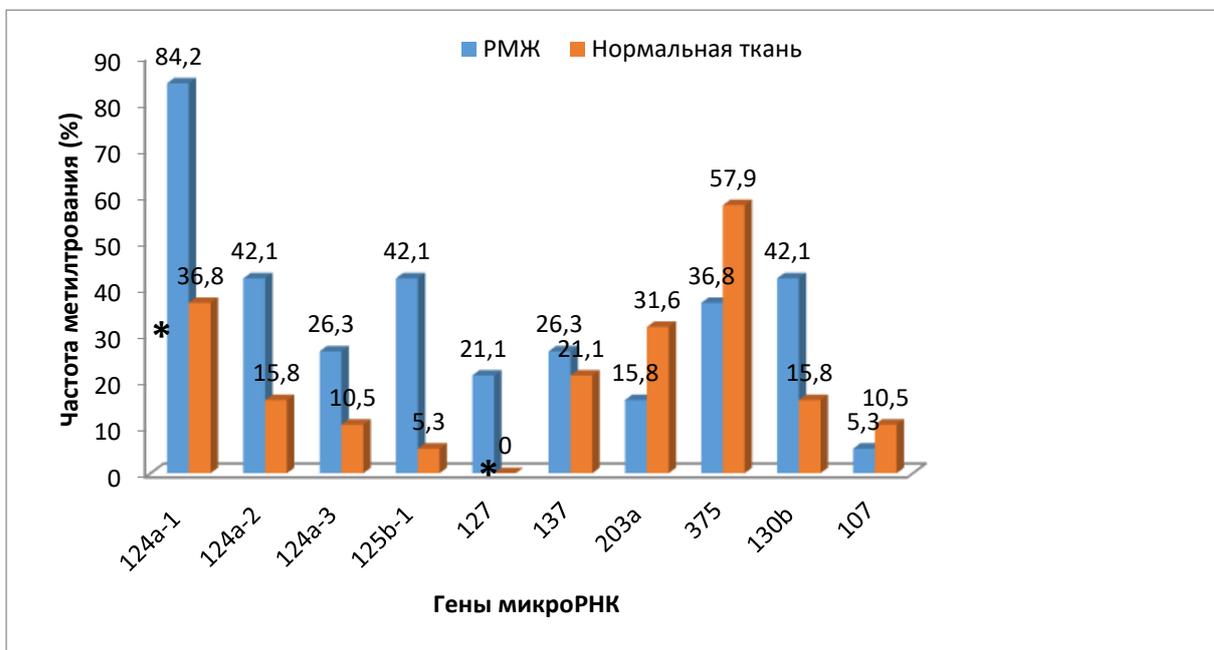
#### **Люминаль-ный В подтип РМЖ**

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 Her2-позитивном, и при Her2 – негативном РМЖ. Частота метилирования этих микроРНК при Her2-позитивным 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.

**Рисунок 2 - Профиль метилирования генов микроРНК при люминальном А подтипе РМЖ. \* – статистически значимый результат ( $p<0.05$ ).**



**Рисунок 3 - Профиль метилирования генов микроРНК при люминальном В Her2 – позитивном подтипе РМЖ.**



*Her2-позитивный люминальный В подтип*

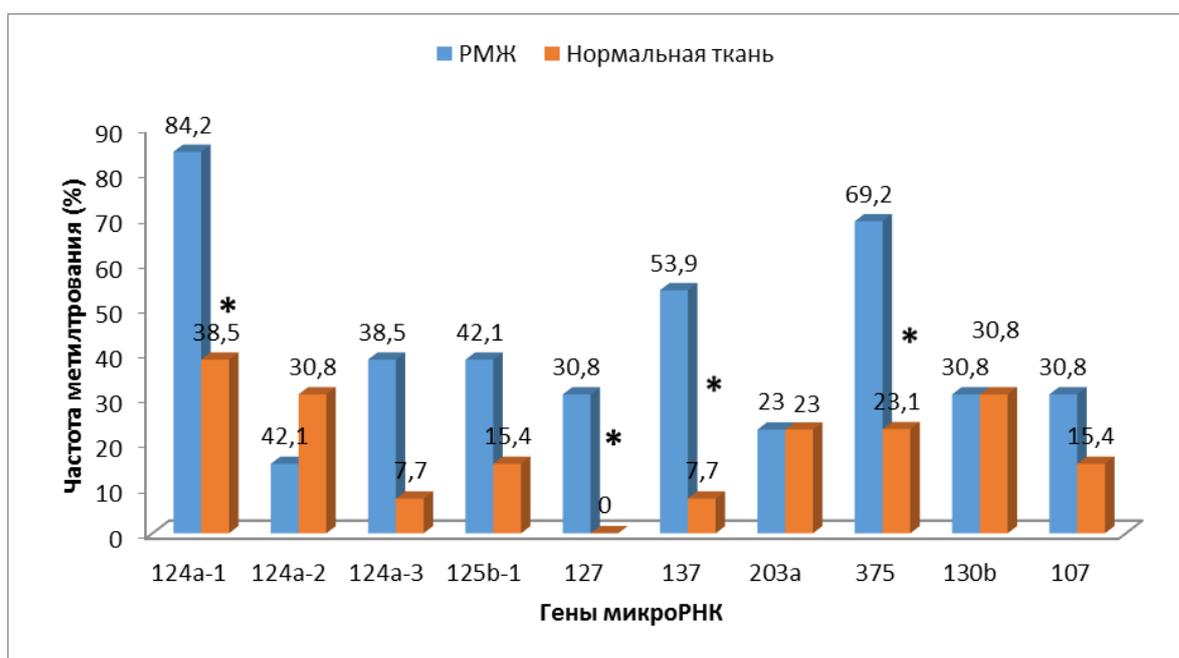
Выполненный анализ частоты метилирования генов для Her2-позитивного В типа РМЖ обнаружил различие высокой достоверности в частоте метилирования *miR-124a-3* и *miR-125b-1*

(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 типа 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 *miR* 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 Zhao. X и соавт. [17]. Эти результаты позволяют отнести *miR-127* 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 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] *miR-130b* подавляет экспрессию протоонкогена *PIEZO2* и гена *DLL1*, тем самым блокируя клеточную инвазию и миграцию [18; 19].

**Рисунок 4 - Профиль метилирования генов микроРНК при люминальном В Her2 – негативном подтипе РМЖ.**



#### Her2-негативный В подтип РМЖ

Выполнено исследование частоты метилирования генов при Her2-негативном В подтипе РМЖ, которое установило увеличение частоты метилирования только одной *miR*. Это касалось *miR-137*, метилирование которой наблюдалось в 53,8% (7/13) образцов ( $p=0.03$ ). Результаты анализа отображены на диаграмме (рис. 4).

Подводя итоги данного раздела работы, хотелось бы отметить несколько интересных наблюдений. Уже на первом этапе анализа обратило внимание, 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 Ward A. и соавт. установили, что восстановление 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 *miR*, гиперметилирование которых мы установили, был значительно шире, чем при Her2 – негативном подтипе. Кроме того, метилирование этих *miR* в опухолевой ткани встречалось значительно чаще по сравнению с гистологически неизменной тканью. Этот факт нам представляется весьма любопытным и требует глубокого 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 *miR*. При данных обстоятельствах следует рассматривать расширенную панель из нескольких *miR*. Широкий спектр вовлеченных *miR*, возможно, указывает на то, что эпигенетическая нестабильность является важным событием в канцерогенезе Her2 – позитивного люминального В подтипа РМЖ.

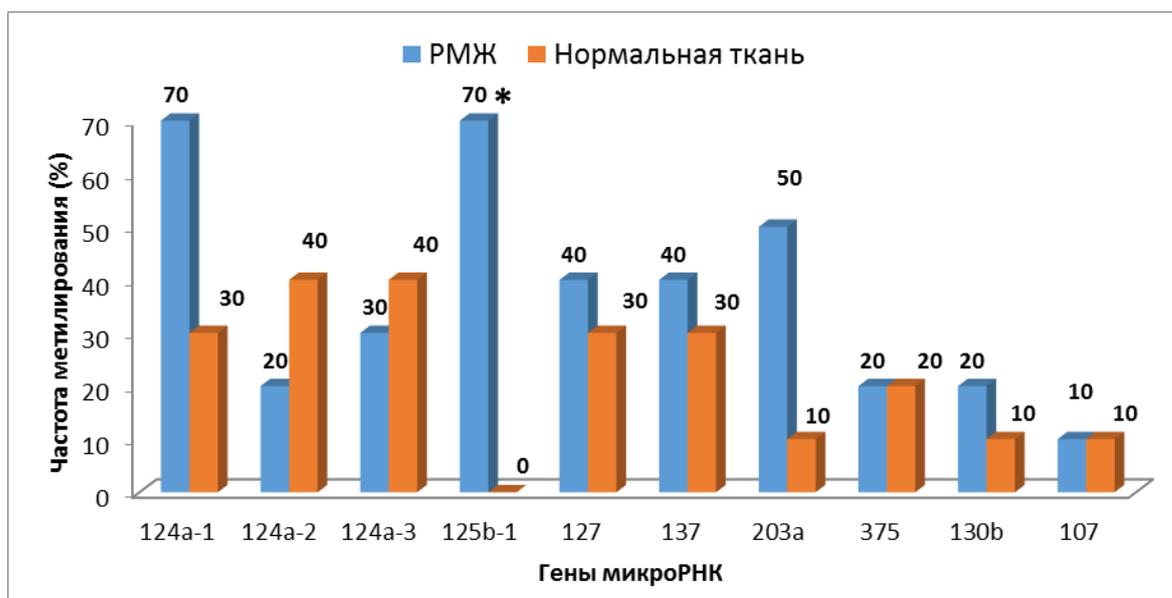
### Нелюминальные подтипы РМЖ

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).

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 рисунке 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.

Рисунок 5 - Профиль метилирования генов микроРНК при трижды- негативном подтипе.



### Заключение

Выполненное исследование установило, что все изученные *miR* демонстрировали повышенные уровни метилирования CpG-островков промоторных областей при РМЖ, что подтверждает литературные данные. Частота метилирования *miR* варьировала при разных молекулярно-биологических подтипах. При каждом подтипе отмечен определенный набор метилированных *miR*. 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 *miR* при Her2-позитивном подтипе. При данном молекулярно-биологическом подтипе РМЖ значительное превышение частоты метилирования установлено для нескольких *miR*. Это весьма важное наблюдение. Учитывая, что люминальный В подтип отличается большими размерами опухоли, частыми поражением лимфоузлов и рецидивированием, использование панели *miR* для установления прогноза РМЖ могло бы быть полезным.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, 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;2(146):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):1-20. Доступно по: <http://vestnik.rncr.ru/vestnik/v18/docs/ryabchikov.pdf>.
4. Рябчиков Д.А. МикроРНК и их роль в патогенезе и диагностике рака молочной железы / Рябчиков Д.А., Воротников 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):12-15. DOI: 10.33667/2078–5631–2020–8(422).
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):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):1122-43. doi: 10.7150/thno.11543.
8. Бурденный, А.М. Роль гиперметиличивания 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. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. 2015;26(2):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., Gil 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., Arii S., Imoto I., Inazawa J. // *Carcinogenesis*, 2010;31:766-776.
11. Peixoto A. Protein Glycosylation and Tumor Microenvironment Alterations Driving Cancer Hallmarks *Front Oncol* / Peixoto A., Relvas-Santos M., Azevedo R., Santos L.L., Ferreira J.A. // 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/ $\beta$ -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., Burdennyaya 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):1842-9. 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. at all. // *Exp Ther Med.*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. , A Balwierz, J D Zhang, M Küblbeck, Y Pawitan, T Hielscher, S Wiemann, Ö Sahin. // *Oncogene.* 2013 Feb 28;32(9):1173-82. 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):14-23.

**Поступила 20.02.2025**