



Оригинальная статья

# Группа гиперметилированных генов длинных некодирующих РНК ассоциирована с разными типами метастазирования рака яичников

Бурдённй А.М.<sup>1,2</sup> • Лукина С.С.<sup>1</sup> • Филиппова Е.А.<sup>1</sup> • Иванова Н.А.<sup>1</sup> • Пронина И.В.<sup>1</sup> • Логинов В.И.<sup>1,3</sup> • Казубская Т.П.<sup>4</sup> • Кушлинский Д.Н.<sup>5,6</sup> • Цекатунов Д.А.<sup>6</sup> • Жордания К.И.<sup>4</sup> • Брага Э.А.<sup>1,3</sup>

**Обоснование.** Опухоли яичников характеризуются бессимптомным течением вплоть до поздних стадий, когда на момент установления диагноза у пациентки уже имеется обширное метастазирование. Помимо лимфогенного и гематогенного метастазирования при раке яичников наблюдаются диссеминация по брюшине, метастазирование в большой сальник и образование асцита; при этом канцероматоз брюшины – преимущественный путь метастазирования рака яичников. В процессах прогрессирования новообразования участвуют эпигенетические факторы: метилирование генов, регуляторные микроРНК и длинные некодирующие РНК (днРНК). В наших предыдущих исследованиях сначала биоинформатически, а затем и экспериментально были идентифицированы 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*), гиперметилированных в опухолях яичников.

**Цель** – оценить клиническую значимость уровней метилирования 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*), ассоциированных с разными типами метастазирования рака яичников, включая лимфогенное, по брюшине, в большой сальник и отдаленные органы.

**Материал и методы.** Уровень метилирования генов днРНК *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*,

*MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1* анализировали с применением количественной метил-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Исследованы 122 парных образцов опухолей яичников, включая 104 злокачественные опухоли и 18 пограничных, а также 45 макроскопических перитонеальных метастазов, собранных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2020 по 2023 г. Исследование включало 21 образец первичной опухоли больных с лимфогенными метастазами, 45 – с диссеминациями по брюшине, 61 – с метастазами в большом сальнике, 49 – с наличием асцита и 9 – с отдаленными метастазами.

**Результаты.** При анализе образцов опухолей больных с метастазами в лимфатических узлах показано статистически значимое повышение уровня метилирования 2 генов днРНК: *SNHG6* ( $p = 0,044$ ) и *SNHG12* ( $p = 0,006$ ). С диссеминацией по брюшине ассоциировано гиперметилирование 4 генов днРНК: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* ( $p < 0,05$ ) и наиболее значимо *TINCR* ( $p = 0,001$ ). С метастазированием в большой сальник ассоциированы *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* ( $p < 0,05$ ) и наиболее значимо *LINC00472* ( $p < 0,001$ ); с наличием асцита – *LINC00472* и *LINC00886* ( $p < 0,05$ ). В перитонеальных макроскопических метастазах относительно парных первичных опухолей отмечено повышение метилирования *MAFG-DT*

( $p < 0,001$ ) и *TP53TG1* ( $p < 0,001$ ) и деметилирование *LINC00886* ( $p = 0,003$ ) и *SNHG12* ( $p = 0,002$ ).

**Заключение.** Проведен анализ клинической значимости 13 гиперметилированных генов днРНК при раке яичников. Впервые установлено, что 10 генов (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) ассоциированы с различными типами метастазирования опухолей данного типа. Выявлены определенные панели днРНК, изменение метилирования которых характерно для лимфогенного и перитонеального метастазирования опухолей яичников.

**Ключевые слова:** рак яичников, перитонеальное метастазирование, большой сальник, асцит, некодирующая РНК, регуляторный фактор

**Для цитирования:** Бурдённй АМ, Лукина СС, Филиппова ЕА, Иванова НА, Пронина ИВ, Логинов ВИ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Цекатунов ДА, Жордания КИ, Брага ЭА. Группа гиперметилированных генов длинных некодирующих РНК ассоциирована с разными типами метастазирования рака яичников. Альманах клинической медицины. 2024;52(3):149–161. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-021.

Поступила 25.03.2024; доработана 23.04.2024; принята к публикации 20.08.2024; опубликована онлайн 04.09.2024



**Р**ак яичников относится к наиболее распространенным и высоколетальным видам рака женской репродуктивной системы в России и за рубежом [1, 2]. По состоянию на 2024 г. в мире диагностируется более 300 тыс. новых случаев рака яичников и ежегодно регистрируется более 200 тыс. неблагоприятных исходов [2]. Опухоли яичников на ранних стадиях характеризуются высокой начальной частотой ответа на стандартную терапию. Однако со временем развивается рецидив, который быстро перерастает в химиорезистентное заболевание. Кроме того, вследствие бессимптомного течения у большинства женщин рак яичников выявляют на поздних стадиях с обширным метастазированием и плохим ответом на химиотерапию, что повышает вероятность неблагоприятного исхода. Помимо лимфогенного и гематогенного метастазирования канцерогенез яичников характеризуется также диссеминацией по брюшине, метастазированием в большой сальник и развитием асцита [3]. Более того, считается, что на момент установления диагноза у большинства больных уже выявляется именно диссеминация по брюшине. Механизм перитонеальной диссеминации мало изучен

и продолжает исследоваться, в том числе на морфологическом, цитологическом и иммунологическом уровнях [4–6]. Поиск биомаркеров перитонеального метастазирования опухолей яичников представляет актуальную задачу биомедицины.

За последние две декады утвердилась точка зрения, что в процессах прогрессирования рака главную роль играют не столько генетические нарушения в опухоль-ассоциированных генах, сколько эпигенетические факторы, такие как ДНК-метилирование генов, модификации гистонов, ремоделирование нуклеосом и хроматина, а также регуляторные микроРНК и длинные некодирующие РНК (днРНК) [7, 8]. Эпигенетическим механизмам уверенно отводится центральное место в регуляции биологических процессов в злокачественных новообразованиях. Эпигенетические модификации обратимы и могут повышать фенотипическую пластичность опухолевой клетки и процессов, вовлеченных в метастазирование рака [7]. Показано, что ДНК-метилирование и регуляторные некодирующие РНК могут служить диагностическими и прогностическими биомаркерами, на основе которых разрабатываются новые методы раннего обнаружения и лечения рака [7, 8].

**Бурденный Алексей Михайлович** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; мл. науч. сотр. лаборатории химической физики биоаналитических процессов<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>.  
✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация. E-mail: burdenny@gmail.com

**Лукина Светлана Сергеевна** – науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>.  
E-mail: sveta\_sergeevna349@mail.ru

**Филиппова Елена Александровна** – канд. мед. наук, науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>. E-mail: p.lenyxa@yandex.ru

**Иванова Наталья Анатольевна** – мл. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3314-6183>.  
E-mail: nata-i@list.ru

**Пронина Ирина Валерьевна** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>.  
E-mail: zolly\_sten@mail.ru

**Логинов Виталий Игоревич** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ст. науч. сотр.<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>. E-mail: loginov7w@gmail.com

**Казубская Татьяна Павловна** – д-р мед. наук, врач-онкогенетик высшей категории, ст. науч. сотр. лаборатории клинической онкогенетики<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>.  
E-mail: oncogen5@ronc.ru

**Кушлинский Дмитрий Николаевич** – канд. мед. наук, доцент кафедры онкологии и патоморфологических дисциплин<sup>5</sup>; заведующий отделением онкогинекологии<sup>6</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1490-8418>.  
E-mail: drkushlinskiy@gmail.com

**Цекатунов Дмитрий Анатольевич** – врач-патологоанатом, заведующий отделением патологической анатомии<sup>6</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1561-9681>.  
E-mail: mtsekatonov@inbox.ru

**Жордания Кирилл Иосифович** – д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения онкогинекологии<sup>6</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3710>.  
E-mail: kiazio2@yandex.ru

**Брага Элеонора Александровна** – д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; вед. науч. сотр.<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>.  
✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация. E-mail: eleonora10\_45@mail.ru

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Емануэля Российской академии наук; 119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115522, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

<sup>5</sup> КГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения» Минздрава Хабаровского края; 680009, г. Хабаровск, ул. Краснодарская, 9, Российская Федерация

<sup>6</sup> КГБУЗ «Краевой клинический центр онкологии» Минздрава Хабаровского края; 680042, г. Хабаровск, Воронежское шоссе, 164, Российская Федерация



Открытие микроРНК и днРНК стало мощным прорывом в анализе транскриптомов и регуляторных генных сетей в злокачественных опухолях. Можно отметить, что анализу микроРНК в новообразованиях посвящено более 10 000 работ, днРНК – более 4000 работ, при раке яичников роль микроРНК исследована в 455 работах, а днРНК – только в 158 работах (поиск в PubMed проведен авторами 27.02.2024). Установлено, что днРНК участвуют в регуляции генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях и могут непосредственно связываться с матричной РНК (мРНК) или белками, а также с ДНК в области промоторов генов или взаимодействовать с мРНК при посредничестве микроРНК или РНК-связывающих белков [9]. Так, в последовательностях и днРНК, и мРНК могут содержаться сайты для связывания микроРНК (англ. MiRNA response elements), благодаря которым днРНК могут конкурировать с мРНК за связывание регуляторных микроРНК по механизму конкурентных эндогенных РНК (англ. ceRNA-model), например при раке яичников [10]. Это один из возможных механизмов участия днРНК в регуляции генов, кодирующих белки, при посредничестве микроРНК.

Исследование закономерностей влияния днРНК на транскриптом в целом и на отдельные РНК в клетках опухолей в частности дает информацию о функциях днРНК. Кроме того, в результате выявляются новые биомаркеры прогрессирования рака. Тканеспецифичный характер экспрессии, эффективное обнаружение в жидкостях организма и стабильность определяют высокий потенциал днРНК в качестве биомаркеров для целей диагностики, прогноза и мониторинга рака, а тканевая специфичность днРНК позволяет разрабатывать селективные терапевтические агенты для лечения рака, включая рак яичников [11, 12].

Ранее в наших исследованиях сначала биоинформатически, а затем и экспериментально были идентифицированы 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TGI*, *TUG1*), гиперметилированных в опухолях яичников [13, 14].

Цель данного исследования – оценить клиническую значимость уровней метилирования 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TGI*, *TUG1*), ассоциированных с разными типами метастазирования рака яичников, включая лимфогенное, по брюшине, в большой сальник и отдаленные органы.

## Материал и методы

Образцы опухолей яичников собраны и охарактеризованы морфологически и клинически в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в течение 2020–2023 гг. Работа проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации [15], с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности; получено информированное согласие пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (протоколы заседаний № 4Б от 24.11.2020 и № 2 от 04.04.2023).

Исследовали образцы больных, которые до операции не получали лучевую, химиотерапию или гормонотерапию. Опухоли были классифицированы в соответствии с TNM (англ. tumor, nodus, and metastasis (опухоль, узел и метастаз) – Международная классификация стадий злокачественных новообразований) Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной организации здравоохранения [16, 17]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином. Образцы тканей хранили при -70 °С. Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора TissueRuptor II (QIAGEN, Германия).

В исследовании использованы 122 парных образца опухолей яичников и гистологически неизмененных тканей яичника (условной нормы), а также 45 макроскопических перитонеальных метастазов. В связи с высокой представленностью перитонеальных (35–38%) и лимфогенных метастазов (7–19%) среди больных с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) выборка включала 104 образца злокачественных опухолей яичников и 18 образцов ПОЯ [18]. Клинико-морфологические характеристики 122 исследованных образцов опухолей яичников отражены в табл. 1.

Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани 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 уровня метилирования генов днРНК проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной

**Таблица 1.** Обобщенные данные по образцам опухолей яичников (N = 122)

| Клинико-гистологический параметр            | Количество, абс. |
|---|------------------|
| <b>Тип опухоли яичников:</b>                |                  |
| пограничная опухоль                         | 18               |
| злокачественная опухоль                     | 104              |
| <b>Гистологический тип:</b>                 |                  |
| серозная аденокарцинома                     | 85               |
| эндометриоидная аденокарцинома              | 15               |
| другие                                      | 22               |
| <b>Стадия:</b>                              |                  |
| I   | 26               |
| II  | 19               |
| III   | 68               |
| IV  | 9                |
| <b>Размер и распространенность опухоли:</b> |                  |
| T1  | 26               |
| T2  | 21               |
| T3  | 75               |
| <b>Степень дифференцировки:</b>             |                  |
| G1  | 25               |
| G2  | 31               |
| G3  | 48               |
| <b>Гематогенное метастазирование:</b>       |                  |
| M0  | 113              |
| M1  | 9                |
| <b>Лимфогенное метастазирование:</b>        |                  |
| N0  | 101              |
| N1–3  | 21               |
| <b>Диссеминация по брюшине:</b>             |                  |
| нет   | 77               |
| есть  | 45               |
| <b>Метастазирование в большой сальник:</b>  |                  |
| нет   | 61               |
| есть  | 61               |
| <b>Метастазирование всех типов:</b>         |                  |
| нет   | 43               |
| есть  | 79               |
| <b>Наличие асцита:</b>                      |                  |
| нет   | 53               |
| есть  | 49               |

полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени, как описано в работах [13, 14]. Использован набор реактивов qPCRMix-HS SYBR по протоколу фирмы «Евроген» (Россия). Амплификацию проводили в системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице [13, 14]. Для сравнительного анализа эффективности амплификации также применяли локус *ACTB* с использованием олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице [13]. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения полимеразной цепной реакции для генов днРНК приведены в табл. 2. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (Promega, США). В качестве позитивного контроля 100% метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ полученных данных по степени метилирования генов днРНК проводили с применением индекса метилирования, рассчитанного для каждого образца. Для оценки значимости различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Анализ данных выполняли с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 27 и Microsoft Excel 10; значимость различий между исследуемыми группами оценивали, используя непараметрический U-тест Манна – Уитни для независимых выборок с учетом поправки Бенджамини – Хохберга на множественное сравнение (англ. false discovery rate, FDR); результат считали значимым при  $p < 0,05$ ,  $FDR = 0,1$ . Для контроля FDR при проведении множественных сравнений с применением метода Бенджамини – Хохберга, поскольку SPSS не имеет встроенной функции для прямого расчета FDR по этому методу, была разработана и применена пользовательская процедура с помощью синтаксиса SPSS. Процедура включала следующие этапы: 1) ранжирование  $p$ -значений; 2) расчет критических значений для каждого теста; 3) определение значимости на основе сравнения  $p$ -значений с критическими значениями; 4) применение правила остановки Бенджамини – Хохберга для определения окончательного набора значимых результатов. Уровень FDR был установлен на 0,1. Корректность процедуры была верифицирована путем сравнения с эталонными расчетами, выполненными в Microsoft Excel.

**Таблица 2.** Праймеры и условия метил-специфичной полимеразной цепной реакции, использованные в данной работе

| Ген днРНК / праймер, нуклеотидная последовательность | Длина, п.н. | Температура отжига, °С |
|--|-------------|------------------------|
| <i>GASS</i>  |             |                        |
| MF: CGTTATCGTCGGTATTGGAGGGG                          | 185         | 60                     |
| MR: CGCCCGACGCCTTATCCC                               |             |                        |
| UF: TGTTATTGTTGGTATTGGAGGGGTGAG                      | 179         | 60                     |
| UR: CAACACCTTATCCCATCTTCTCCA                         |             |                        |
| <i>HOTAIR</i>  |             |                        |
| MF: CGGGTTTTTATTTTTTCGTTATTGCG                       | 258         | 54                     |
| MR: CGACTACTCTCGCAAATTTCACTACTTC                     |             |                        |
| UF: TGGGTTTTTATTTTTTGTATTGTGTTATTTG                  | 258         | 52                     |
| UR: CAACTACTCTCACAAATTTCACTACTTCACAC                 |             |                        |
| <i>LINC00472</i>                                     |             |                        |
| MF: AAGGCGTTTTAAGTCGAGGGTA                           | 224         | 60                     |
| MR: AACGACTCCGACAACACACC                             |             |                        |
| UF: AAGGTGTTTTAAGTTGAGGGTAAAG                        | 228         | 59                     |
| UR: AACAACTCCAACAACACACCCAC                          |             |                        |
| <i>LINC00886</i>                                     |             |                        |
| MF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA                        | 172         | 60                     |
| MR: CGCCGAATTACGCGACGAAA                             |             |                        |
| UF: CGTGCGATCGTAGTTCGGTAGGTTA                        | 181         | 60                     |
| UR: CCTCACCAAATTACACAACAAATCAACAC                    |             |                        |
| <i>MAFG-DT</i>                                       |             |                        |
| MF: CGGATTTTCGGGCGTTTCG                              | 232         | 60                     |
| MR: ATTTCGAATCTACCGCGCAC                             |             |                        |
| UF: TGTGGATTTTTGGGTGTTTTGTTG                         | 236         | 60                     |
| UR: ATTTCAAATCTACCACACACCC                           |             |                        |
| <i>PLUT</i>  |             |                        |
| MF: CGGGGATTTGGTATTGTGTGGC                           | 201         | 60                     |
| MR: СТАААССТААССТСТТААТАСГАССААССА                   |             |                        |
| UF: TGTTGGAATGTGTATGGGTTTTTGTAAGTT                   | 339         | 61                     |
| UR: CACAАТАССТАААССТААССТСТТААТАСААССА               |             |                        |
| <i>SNHG1</i>   |             |                        |
| MF: CGGCGATCGAGGTTTTAGGA                             | 210         | 60                     |
| MR: АСТААСТСАССГАССГАТТ                              |             |                        |



|   |     |    |
|---|-----|----|
| UF: TGGTGATTGAGGTTTTAGGA                  | 210 | 55 |
| UR: ACTAACTCACCAACCACATT                  |     |    |
| <i>SNHG6</i>                              |     |    |
| MF: TTGAGTTATCGCGTTCGGTTT                 | 295 | 61 |
| MR: CTCTTCCGATACGCGACCC                   |     |    |
| UF: CTCTTCCAATACACAACCC                   | 295 | 58 |
| UR: CAAAAACCATAAACCCCTCC                  |     |    |
| <i>SNHG12</i>                             |     |    |
| MF: CGCGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGAAGAGATAAG | 239 | 60 |
| MR: CCCGACGCTAAACCCACGC                   |     |    |
| UF: TGTGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGAAGAGATAAG | 245 | 56 |
| UR: TCAATACCCAACACTAAACCCACAC             |     |    |
| <i>SNHG17</i>                             |     |    |
| MF: GCGCGAAACGAGCGTA                      | 168 | 59 |
| MR: CGACGCCCTAACGTCGAATA                  |     |    |
| UF: TTGGTGTGAAATGAGTGTA                   | 170 | 57 |
| UR: CAACACCCTAACATCAAATAACA               |     |    |
| <i>TINCR</i>                              |     |    |
| MF: GCGGACGAGGCGTTGTTGTAT                 | 193 | 60 |
| MR: CGCTAACGAACAACAACCCGAAC               |     |    |
| UF: GTGGATGAGGTGTTGTTATTGTTGATT           | 194 | 60 |
| UR: TCACTAACAAACAACAACCCAAACATC           |     |    |
| <i>TP53TG1</i>                            |     |    |
| MF: TCGTTTCGTGTTTGACGTC                   | 137 | 55 |
| MR: ACTCATTTAACACCCGACGA                  |     |    |
| UF: GTTTTGTTTTGTTTGATGTT                  | 137 | 55 |
| UR: ACTCATTTAACACCAACAAACC                |     |    |
| <i>TUG1</i>                               |     |    |
| MF: CGGGTTTCGGTTTCGTGGTC                  | 199 | 60 |
| MR: CGACGAAAACGACAACAACATAATT             |     |    |
| UF: TGGTTTTTAAGGATTGGATTGAGGGTAG          | 159 | 60 |
| UR: CAACAACAACAAAACAACAACACATAAT          |     |    |

MF/UF и MR/UR – прямые и обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю соответственно. Олигонуклеотиды подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <http://www.urogene.org/methprimer2/> с проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR (США). Для гена *TP53TG1* использованы олигонуклеотиды из работы [19]

**Таблица 3.** Уровни метилирования 2 генов днРНК в опухолях больных с метастазами в лимфоузлах и без лимфогенных метастазов

| Ген днРНК | Лимфогенное метастазирование | Уровень метилирования, % | Значение p |
|-----------|------------------------------|--------------------------|------------|
| SNHG6     | N0                           | 24,41 [12,14; 47,51]     | 0,044      |
|           | N1–3                         | 50,59 [12,12; 64,11]     |            |
| SNHG12    | N0                           | 21,42 [7,49; 37,34]      | 0,006      |
|           | N1–3                         | 42,95 [37,38; 48,84]     |            |

Исследованы 21 образец опухолей больных с метастазами в лимфатических узлах и 101 образец опухолей больных без лимфогенных метастазов; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

## Результаты

Проведен сравнительный анализ уровней метилирования 13 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) в 122 образцах опухолевой и гистологически нормальной ткани яичников, охарактеризованных клинически и морфологически (см. табл. 1), в зависимости от наличия разных типов метастазирования. Кроме того, исследованы 45 макроскопических метастазов относительно 45 парных первичных опухолей тех же больных.

При анализе образцов опухолей больных с метастазами в лимфатических узлах относительно образцов опухолей больных без лимфатических метастазов статистически значимое ( $p < 0,05$ , FDR = 0,1) повышение уровня метилирования отмечено только для 2 генов днРНК из 13 исследованных – *SNHG6* и *SNHG12* (табл. 3), для которых связь с метастазами в лимфатические узлы была отмечена также ранее в работе [14].

В образцах опухолей больных с диссеминацией по брюшине показан статистически значимое ( $p < 0,05$ , FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования 4 генов днРНК: *GAS5*, *LINC00472* и наиболее значимо *HOTAIR* и *TINCR* ( $p = 0,001$ , FDR = 0,1)

(табл. 4). В образцах опухолей больных с метастазированием в большой сальник был статистически значимо более высокий уровень метилирования другого набора из 4 генов днРНК: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* ( $p < 0,05$ , FDR = 0,1) и наиболее значимо *LINC00472* ( $p < 0,001$ , FDR = 0,1) (табл. 5).

При анализе образцов опухолей больных с метастазами всех (любых) типов относительно образцов опухолей пациентов без метастазов получен статистически значимое ( $p < 0,05$ , FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования 7 генов днРНК: *GAS5*, *LINC00886*, *TINCR*, *TUG1*, *HOTAIR*, *SNHG6*, при этом наиболее значимо *LINC00472* ( $p < 0,001$ , FDR = 0,1), а также обнаружено статистически значимое ( $p < 0,05$ , FDR = 0,1) снижение уровня метилирования гена *MAFG-DT* (табл. 6).

Связи данных гиперметилированных генов днРНК с гематогенным метастазированием не установлено, очевидно, вследствие малого количества (9) образцов опухолей больных с отдаленными метастазами в исследуемой выборке. Однако данные по метилированию генов днРНК в опухолях больных с отдаленными метастазами были учтены при анализе связи гиперметилированных генов днРНК с учетом всех типов метастазирования (табл. 7).

**Таблица 4.** Уровни метилирования 4 генов днРНК в опухолях больных с диссеминацией по брюшине и без таковой

| Ген днРНК | Диссеминация по брюшине | Уровень метилирования, % | Значение p |
|-----------|-------------------------|--------------------------|------------|
| HOTAIR    | Нет                     | 4,49 [2,94; 5,64]        | 0,001      |
|           | Есть                    | 6,39 [4,97; 7,83]        |            |
| TINCR     | Нет                     | 27,16 [5,86; 47,55]      | 0,001      |
|           | Есть                    | 45,41 [37,69; 53,64]     |            |
| GAS5      | Нет                     | 4,46 [0,71; 9,68]        | 0,026      |
|           | Есть                    | 8,60 [6,72; 9,60]        |            |
| LINC00472 | Нет                     | 2,14 [0,88; 5,44]        | 0,041      |
|           | Есть                    | 5,20 [0,89; 8,30]        |            |

Исследованы 45 образцов опухолей больных с диссеминацией по брюшине и 77 образцов опухолей больных без диссеминации по брюшине; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

**Таблица 5.** Уровни метилирования 4 генов днРНК в опухолях больных с метастазами в большом сальнике и без таковых

| Ген днРНК        | Метастазирование в большой сальник | Уровень метилирования, % | Значение p |
|------------------|------------------------------------|--------------------------|------------|
| <i>HOTAIR</i>    | Нет                                | 4,49 [3,06; 5,77]        | 0,003      |
|                  | Есть                               | 6,30 [4,78; 7,83]        |            |
| <i>GASS</i>      | Нет                                | 4,92 [0,77; 9,04]        | 0,033      |
|                  | Есть                               | 8,94 [7,05; 9,53]        |            |
| <i>LINC00472</i> | Нет                                | 1,52 [0,75; 4,24]        | < 0,001    |
|                  | Есть                               | 6,42 [2,77; 8,25]        |            |
| <i>LINC00886</i> | Нет                                | 6,16 [0,84; 13,57]       | 0,021      |
|                  | Есть                               | 9,62 [7,83; 12,86]       |            |

Исследованы 61 образец опухолей больных с метастазами в большом сальнике и 61 образец опухолей больных без метастазов в большом сальнике; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

Для перитонеальных макроскопических метастазов по сравнению с парными первичными опухолями обнаружен статистически значимо меньший уровень метилирования *LINC00886* и *SNHG12* ( $p \leq 0,003$ , FDR = 0,1), что может указывать на активацию днРНК, кодируемых этими генами, при формировании метастатического узла (см. табл. 7). Кроме того, в перитонеальных макроскопических метастазах наблюдается статистически значимо ( $p < 0,001$ , FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования относительно

первичных опухолей для генов *MAFG-DT* и *TP53TG1* (см. табл. 7).

В образцах опухолей больных с наличием асцита относительно образцов больных без асцита получен статистически значимо ( $p < 0,05$ , FDR = 0,1) более высокий уровень метилирования 2 генов днРНК: *LINC00472* и *LINC00886* (табл. 8).

Для генов *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1* и *SNHG17*, гиперметилированных в опухолях яичников, не выявлено статистически значимой связи уровня метилирования с метастазированием.

**Таблица 6.** Сравнение уровней метилирования 8 генов днРНК в опухолях больных с метастазами и без таковых в целом с учетом всех типов метастазирования, включая отдаленные метастазы

| Ген днРНК        | Метастазирование всех типов | Уровень метилирования, % | Значение p |
|------------------|-----------------------------|--------------------------|------------|
| <i>HOTAIR</i>    | Нет                         | 4,38 [3,01; 5,45]        | 0,002      |
|                  | Есть                        | 6,05 [3,73; 7,57]        |            |
| <i>TUG1</i>      | Нет                         | 4,66 [0,71; 5,52]        | 0,024      |
|                  | Есть                        | 5,455 [3,8; 6,48]        |            |
| <i>SNHG6</i>     | Нет                         | 16,95 [8,96; 35,08]      | 0,005      |
|                  | Есть                        | 35,44 [12,73; 60,29]     |            |
| <i>TINCR</i>     | Нет                         | 22,84 [6,05; 47,87]      | 0,039      |
|                  | Есть                        | 44,18 [25,0; 49,27]      |            |
| <i>GASS</i>      | Нет                         | 3,3 [0,57; 8,97]         | 0,022      |
|                  | Есть                        | 8,44 [2,08; 9,64]        |            |
| <i>LINC00472</i> | Нет                         | 1,4 [0,71; 2,78]         | < 0,001    |
|                  | Есть                        | 6,095 [1,375; 8,26]      |            |
| <i>LINC00886</i> | Нет                         | 4,49 [0,83; 14,5]        | 0,046      |
|                  | Есть                        | 9,5 [6,34; 12,84]        |            |
| <i>MAFG-DT</i>   | Нет                         | 5,53 [1,93; 7,42]        | 0,039      |
|                  | Есть                        | 2,355 [1,22; 6,13]       |            |

Исследованы 79 образцов опухолей больных с наличием любых метастазов и 43 образца опухолей больных без каких-либо метастазов; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]



**Таблица 7.** Сравнение уровней метилирования 4 генов днРНК в макроскопических перитонеальных метастазах относительно парной первичной опухоли

| Ген днРНК        | Опухоль / макрометастаз | Уровень метилирования, % | Значение p |
|------------------|-------------------------|--------------------------|------------|
| <i>MAFG-DT</i>   | Опухоль                 | 2,41 [1,26; 4,96]        | < 0,001    |
|                  | Макрометастаз           | 6,2 [5,38; 8,11]         |            |
| <i>TP53TG1</i>   | Опухоль                 | 2,85 [1,38; 5,46]        | < 0,001    |
|                  | Макрометастаз           | 6,2 [4,56; 8,18]         |            |
| <i>SNHG12</i>    | Опухоль                 | 9,16 [7,67; 23,82]       | 0,002      |
|                  | Макрометастаз           | 1,88 [0,23; 18,26]       |            |
| <i>LINC00886</i> | Опухоль                 | 8,47 [6,38; 12,76]       | 0,003      |
|                  | Макрометастаз           | 6,44 [3,82; 8,27]        |            |

Исследованы 45 образцов макроскопических перитонеальных метастазов относительно 45 образцов парных первичных опухолей; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

**Таблица 8.** Уровни метилирования 2 генов днРНК в опухолях больных с асцитом и без асцита

| Ген днРНК        | Наличие асцита | Уровень метилирования, % | Значение p |
|------------------|----------------|--------------------------|------------|
| <i>LINC00472</i> | Нет            | 1,99 [0,71; 6,09]        | 0,022      |
|                  | Есть           | 5,80 [0,89; 8,51]        |            |
| <i>LINC00886</i> | Нет            | 5,34 [0,83; 9,49]        | 0,022      |
|                  | Есть           | 9,04 [4,96; 12,75]       |            |

Исследованы 49 образцов опухолей больных с наличием асцита и 53 образца опухолей больных без асцита; приведены медиана (Me) и квартили [Q1; Q3]

## Обсуждение

Проведен анализ уровня метилирования 13 генов днРНК на представительной выборке из 122 образцов опухолей яичников и 45 макроскопических перитонеальных метастазов, что позволило оценить связь 10 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) с разными типами метастазирования.

Показано, что гиперметилирование гена днРНК *GAS5* (growth arrest specific 5) ассоциировано с перитонеальным метастазированием опухолей яичников – как с диссеминацией по брюшине, так и с метастазированием в сальник. Эти результаты согласуются с данными о супрессорных и антиметастатических функциях днРНК *GAS5* в опухолях разных локализаций, включая рак яичников [20, 21]. В недавней работе установлено, что *GAS5* может ингибировать метастазирование рака яичников путем подавления экспрессии РНК-связывающего белка, hnRNPК (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид К), в результате ингибирования путей PI3K/AKT/mTOR [22].

Напротив, для генов *SNHG6* (small nucleolar RNA host gene 6) и *SNHG12* (small nucleolar RNA host gene 12) из семейства днРНК, образовавшихся из генов-хозяев малых ядрышковых РНК, обнаружена связь метилирования с лимфогенным метастазированием. Следует отметить, что в отличие от малых ядрышковых РНК, происходящих из одних интронов, днРНК семейства SNHG (small nucleolar RNA host gene) содержат последовательности как интронов, так и экзонов; всего известно более 30 таких днРНК [23]. Ранее для днРНК *SNHG6* и *SNHG12* связь с метастазированием была определена при раке яичников и в опухолях других локализаций, но данные были противоречивы [24–26]. Наши результаты, основанные на исследовании метилирования генов днРНК, позволяют предположить супрессорные антиметастатические свойства для днРНК *SNHG6* в опухолях яичников, что согласуется с результатами исследования функции *SNHG6* в опухолях толстой кишки [24].

Для гена антисмысловой днРНК *HOTAIR* (HOX transcript antisense RNA) также было обнаружено aberrантное ДНК-метилирование при раке

яичников и отмечена его связь с химиорезистентностью [27]. В нашей работе выявлена связь метилирования гена *HOTAIR* с диссеминацией по брюшине и с метастазированием в большой сальник.

Для межгенной днРНК *LINC00472* (long intergenic non-protein coding RNA 472) ранее были определены супрессорные свойства и роль метилирования в инактивации гена этой днРНК в опухолях желудка и молочной железы [28, 29]. Для межгенной днРНК *LINC00886* (long intergenic non-protein coding RNA 886) также имелись данные о роли гиперметилирования в снижении экспрессии гена этой днРНК и об участии *LINC00886* в подавлении эпителиально-мезенхимального перехода при некоторых видах рака [30, 31]. Нами впервые обнаружена ассоциация метилирования генов *LINC00472* и *LINC00886* с метастазированием в большой сальник и с образованием асцитической жидкости у больных с опухолями яичников. Наши результаты подтверждают супрессорный характер этих днРНК, установленный для опухолей других локализаций [28–31].

Отметим, что роль днРНК *TINCR* (terminal differentiation induced ncRNA) в канцерогенезе выявлена при анализе опухолей разных локализаций, но сведения о возможной супрессорной и антиметастатической или онкогенной функции были противоречивы [32, 33]. Роль днРНК *TINCR* при раке яичников не исследована другими авторами. В настоящей работе нами впервые определено влияние гиперметилирования гена *TINCR* на диссеминацию опухолей яичников по брюшине, что согласуется с данными о сниженной экспрессии *TINCR* и возможной супрессорной функции этой днРНК при некоторых видах рака: глиоме, ретинобластоме и раке предстательной железы [33].

В макроскопических перитонеальных метастазах при раке яичников нами было обнаружено гиперметилирование генов *TP53TG1* и *MAFG-DT*. Для антисмысловой днРНК *MAFG-DT* (*MAFG divergent transcript*, или *MAFG-AS1*) ранее показаны повышенная экспрессия в опухолях и способность индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию и миграцию клеток рака яичников [34]. Межгенная днРНК *TP53TG1* (tumor protein 53 target 1), как и ее мишень *TP53*, играет преимущественно супрессорную роль при различных видах рака, например при раке шейки матки [35]. *TP53TG1* может подавлять метастазирование желудка и гепатоцеллюлярной карциномы [36, 37]. Обращает на себя внимание, что гиперметилирование генов *TP53TG1* и *MAFG-DT* наблюдается только в макроскопических перитонеальных метастазах, хотя эти гены не повышали

уровень метилирования в первичных опухолях яичников; и напротив, отмечено снижение уровня метилирования гена *MAFG-DT* при тотальном анализе образцов опухолей с любыми типами метастазирования. Таким образом, для определения роли метилирования генов днРНК *MAFG-DT* и *TP53TG1* с противоположными свойствами (онкогенов и опухолевых супрессоров) в колонизации вторичных очагов в брюшине у больных раком яичников нужны дальнейшие исследования.

На основании полученных результатов определены наборы гиперметилированных генов днРНК, ассоциированных с разными типами метастазирования опухолей яичников. Так, с лимфогенным метастазированием оказались связаны 2 гена – *SNHG6* и *SNHG12*, другие 5 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *TINCR*) могут быть вовлечены в перитонеальное метастазирование, включая диссеминацию по брюшине и метастазирование в большой сальник. Повышенное метилирование *HOTAIR* и *TINCR* ( $p = 0,001$ ,  $FDR = 0,1$ ) в опухоли ассоциировано с диссеминацией по брюшине, а повышенный уровень метилирования гена *LINC00472* ( $p < 0,001$ ,  $FDR = 0,1$ ) – с метастазированием в большой сальник. Повышенный уровень метилирования генов *LINC00472* и *LINC00886* в опухолях больных может быть ассоциирован с развитием асцита. Для перитонеальных макроскопических метастазов характерно значимое ( $p < 0,001$ ,  $FDR = 0,1$ ) повышение уровня метилирования генов *MAFG-DT* и *TP53TG1*, не проявляющих повышенного метилирования в первичных опухолях яичников, а также снижение уровня метилирования *LINC00886* и *SNHG12*.

Настоящее исследование ограничено анализом клинических образцов. Выявленные закономерности в дальнейшем планируется тестировать на клеточных культурах.

## Заключение

Впервые проведено сравнение клинической значимости 13 гиперметилированных днРНК и установлено, что 10 генов днРНК (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) ассоциированы с различными типами метастазирования опухолей данного типа. Определены гены днРНК, связанные с метастазированием в лимфатические узлы (*SNHG6* и *SNHG12*), диссеминацией по брюшине (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* и *TINCR*) и метастазированием в большой сальник (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* и *LINC00886*). В перитонеальных макроскопических метастазах относительно парных первичных опухолей наблюдаются



гиперметилирование *MAFG-DT* и *TP53TG1* и деметилирование *LINC00886* и *SNHG12*. Проведение дальнейших исследований позволит оценить

клиническую значимость выявленных в данной работе новых панелей маркеров для эффективного мониторинга течения рака яичников. ©

## Дополнительная информация

### Финансирование

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-15-00368-П).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Участие авторов

А.М. Бурдённый – дизайн исследования, подбор праймеров, выполнение эксперимента, редактирование статьи; С.С. Лукина – выполнение эксперимента, статистический анализ полученных данных, редактирование статьи; Е.А. Филиппова – статистический анализ полученных данных, оформление таблиц и иллюстраций, обсуждение результатов, участие в редактировании статьи; Н.А. Иванова – выполнение эксперимента, анализ результатов, участие в обсуждении результатов и редактировании статьи; И.В. Пронина – выполнение эксперимента, участие в анализе

литературных данных и обсуждении результатов, редактирование статьи; В.И. Логинов – сбор и анализ характеристик клинических образцов, подбор праймеров, редактирование статьи; Т.П. Казубская – сбор и характеристика клинических образцов, участие в обсуждении результатов, редактирование статьи; Д.И. Кушлинский – лечение больных, анализ историй болезни, участие в сопоставлении результатов с клиническими характеристиками пациентов, обсуждение результатов, редактирование статьи; Д.А. Цекатунов – морфологическое исследование опухолей, обсуждение результатов, сопоставление результатов с морфологическими характеристиками опухолей, редактирование статьи; К.И. Жордания – сбор и характеристика клинических образцов, обсуждение результатов, редактирование статьи; Э.А. Брага – дизайн исследования, анализ литературы, написание и окончательное редактирование статьи. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

## Список литературы / References

- Каприн АД, Старинский ВВ, Шахзадова АО, Лисичникова ИВ, ред. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2023. 275 с.
- Kaprin AD, Starinsky VV, Shakhzadova AO, Lisichnikova IV, editors. Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Moscow: P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russian Federation; 2023. 275 p. Russian.
- Sideris M, Menon U, Manchanda R. Screening and prevention of ovarian cancer. *Med J Aust.* 2024;220(5):264–274. doi: 10.5694/mja2.52227.
- Pascual-Antón L, Cardeñes B, Sainz de la Cuesta R, González-Cortijo L, López-Cabrera M, Cabañas C, Sandoval P. Mesothelial-to-mesenchymal transition and exosomes in peritoneal metastasis of ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11496. doi: 10.3390/ijms222111496.
- Purbadi S, Anggraeni TD, Vitria A. Early stage epithelial ovarian cancer metastasis through peritoneal fluid circulation. *J Ovarian Res.* 2021;14(1):44. doi: 10.1186/s13048-021-00795-z.
- Ibrahim LI, Hajal C, Offeddu GS, Gillrie MR, Kamm RD. Omentum-on-a-chip: A multicellular, vascularized microfluidic model of the human peritoneum for the study of ovarian cancer metastases. *Biomaterials.* 2022;288:121728. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121728.
- Miyamoto T, Murphy B, Zhang N. Intraperitoneal metastasis of ovarian cancer: New insights on resident macrophages in the peritoneal cavity. *Front Immunol.* 2023;14:1104694. doi: 10.3389/fimmu.2023.1104694.
- Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Kan RL, Chen J, Sallam T. Crosstalk between epitranscriptomic and epigenetic mechanisms in gene regulation. *Trends Genet.* 2022;38(2):182–193. doi: 10.1016/j.tig.2021.06.014.
- Salmena L, Polisenno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell.* 2011;146(3):353–358. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.014.
- Braga EA, Fridman MV, Moscovtsev AA, Filippova EA, Dmitriev AA, Kushlinskii NE. LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8855. doi: 10.3390/ijms21228855.
- Kunej T, Obsteter J, Pogacar Z, Horvat S, Calin GA. The decalog of long non-coding RNA involvement in cancer diagnosis and monitoring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2014;51(6):344–357. doi: 10.3109/10408363.2014.944299.
- Lampropoulou DI, Papadimitriou M, Papadimitriou C, Filippou D, Kourlaba G, Aravantinos G, Gazouli M. The role of EMT-related lncRNAs in ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2023;24(12):10079. doi: 10.3390/ijms241210079.
- Бурдённый АМ, Филиппова ЕА, Лукина СС, Иванова НА, Пронина ИВ, Логинов ВИ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ, Брага ЭА. ДНК-метилирование группы генов длинных некодирующих РНК на разных этапах диссеминации рака яичников. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;176(10):498–504. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-10-498-504. Burdennyu AM, Filippova EA, Lukina SS, Ivanova NA, Pronina IV, Loginov VI, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Braga EA. [DNA-methylation of a group of long non-coding RNA genes at different stages of ovarian cancer dissemination.] *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2023;176(10):498–504. Russian. doi: 10.47056/0365-9615-2023-176-10-498-504.
- Лукина СС, Бурдённый АМ, Филиппова ЕА, Урошлев ЛА, Пронина ИВ, Иванова НА, Фридман МВ, Жордания КИ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ, Логинов ВИ, Брага ЭА. Метилирование генов длинных некодирующих РНК: SNHG6, SNHG12, TINCR при раке яичников. *Молекулярная биология.* 2024;58(3):429–438. doi: 10.1134/S0026893324700067. Lukina SS, Burdennyu AM, Filippova EA, Uroshlev LA, Pronina IV, Ivanova NA, Fridman MV, Zhordania KI, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Loginov VI, Braga EA. [Methylation of long noncoding RNA genes SNHG6, SNHG12, and TINCR in ovarian cancer.] *Mol Biol.* 2024;58(3):429–438. Russian. doi: 10.1134/S0026893324700067.
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191–2194. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C., editors. *The TNM classification of malignant tumours.* 8th edn. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2017. 272 p.
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. *WHO Classification of tumours of female reproductive organs.* 4th edn. Lyon, France: IARC Press; 2014. 307 p.
- Новикова ЕГ, Андреева ЮЮ, Шевчук АС. *Пограничные опухоли яичников.* Онкология.



- Журнал им. П.А. Герцена. 2013;2(1):84–91. doi: 10.17116/onkolog201320184.
- Novikova EG, Andreeva YuYu, Shevchuk AS. [Borderline ovarian tumors.] P.A. Herzen Journal of Oncology. 2013;2(1):84–91. Russian. doi: 10.17116/onkolog201320184.
19. Diaz-Lagares A, Crujeiras AB, Lopez-Serra P, Soler M, Setien F, Goyal A, Sandoval J, Hashimoto Y, Martinez-Cardús A, Gomez A, Heyn H, Moutinho C, Espada J, Vidal A, Paúles M, Galán M, Sala N, Akiyama Y, Martínez-Iniesta M, Farré L, Villanueva A, Gross M, Diederichs S, Guil S, Esteller M. Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(47):E7535–E7544. doi: 10.1073/pnas.1608585113.
20. Yang W, Xu X, Hong L, Wang Q, Huang J, Jiang L. Upregulation of lncRNA GAS5 inhibits the growth and metastasis of cervical cancer cells. J Cell Physiol. 2019;234(12):23571–23580. doi: 10.1002/jcp.28926.
21. Dong Q, Long X, Cheng J, Wang W, Tian Q, Di W. LncRNA GAS5 suppresses ovarian cancer progression by targeting the miR-96-5p/PTEN axis. Ann Transl Med. 2021;9(24):1770. doi: 10.21037/atm-21-6134.
22. Zhang T, Leng Y, Duan M, Li Z, Ma Y, Huang C, Shi Q, Wang Y, Wang C, Liu D, Zhao X, Cheng S, Liu A, Zhou Y, Liu J, Pan Z, Zhang H, Shen L, Zhao H. LncRNA GAS5-hnRNPK axis inhibited ovarian cancer progression via inhibition of AKT signaling in ovarian cancer cells. Discov Oncol. 2023;14(1):157. doi: 10.1007/s12672-023-00764-6.
23. Zimta AA, Tigu AB, Braicu C, Stefan C, Ionescu C, Berindan-Neagoe I. An emerging class of long non-coding RNA with oncogenic role arises from the snoRNA host genes. Front Oncol. 2020;10:389. doi: 10.3389/fonc.2020.00389.
24. Meng S, Jian Z, Yan X, Li J, Zhang R. LncRNA SNHG6 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via the PI3K/AKT/mTOR pathway in colorectal cancer. Mol Med Rep. 2019;20(3):2541–2548. doi: 10.3892/mmr.2019.10510.
25. Zhang T, Beeharry MK, Wang Z, Zhu Z, Li J, Li C. YY1-modulated long non-coding RNA SNHG12 promotes gastric cancer metastasis by activating the miR-218-5p/YWHAZ axis. Int J Biol Sci. 2021;17(7):1629–1643. doi: 10.7150/ijbs.58921.
26. Su M, Huang P, Li Q. Long noncoding RNA SNHG6 promotes the malignant phenotypes of ovarian cancer cells via miR-543/YAP1 pathway. Heliyon. 2023;9(5):e16291. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16291.
27. Teschendorff AE, Lee SH, Jones A, Fiegl H, Kalwa M, Wagner W, Chindera K, Evans I, Dubeau L, Orjalo A, Horlings HM, Niederreiter L, Kaser A, Yang W, Goode EL, Fridley BL, Jenner RG, Berns EM, Wik E, Salvesen HB, Wisman GB, van der Zee AG, Davidson B, Trope CG, Lambrechts S, Vergote I, Calvert H, Jacobs IJ, Widschwendter M. HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian

## The group of hypermethylated long noncoding RNA genes is associated with different types of metastasis in ovarian cancer

A.M. Burdenny<sup>1,2</sup> • S.S. Lukina<sup>1</sup> • E.A. Filippova<sup>1</sup> • N.A. Ivanova<sup>1</sup> • I.V. Pronina<sup>1</sup> • V.I. Loginov<sup>1,3</sup> • T.P. Kazubskaya<sup>4</sup> • D.N. Kushlinskiy<sup>5,6</sup> • D.A. Tsekatonov<sup>6</sup> • K.I. Zhordania<sup>4</sup> • E.A. Braga<sup>1,3</sup>

**Background:** Ovarian tumors are characterized by asymptomatic progression until their late stages, when at the time of diagnosis the patient already has extensive metastatic disease. In addition to lymphogenous and hematogenous metastasis in ovarian cancer, there are peritoneal dissemination and metastasis to the greater omentum with ascites; moreover, peritoneal carcinomatosis is the predominant route of metastasizing of ovarian cancer. Epigenetic factors, such as gene methylation, regulatory microRNAs and long non-coding RNAs (lncRNAs), contribute to progression of this cancer. Our previous bioinformatic and experimental studies have identified 13 genes of lncRNAs (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) hypermethylated in the ovarian neoplasms.

**Aim:** To evaluate the clinical significance of methylation levels of 13 lncRNA genes (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) associated with various types of ovarian cancer metastasis, including lymphogenous, peritoneal, omental, and distant metastases.

**Methods:** The methylation levels of lncRNA genes *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *PLUT/PDX1-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *SNHG17*,

*TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1* were analyzed by quantitative real-time methylation-specific polymerase chain reaction. We tested 122 duplicate samples of ovarian neoplasms, including 104 malignancies and 18 borderline tumors, as well as 45 peritoneal macro metastases, collected in the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology in 2020 to 2023. The study included 21 samples of primary tumor from patients with lymphogenous metastases, 45 samples from patients with peritoneal dissemination, 61 from those with omental metastases, 49 from patients with ascites, and 9 with distant metastases.

**Results:** The tumor samples from the patients with lymphatic nodes metastases showed a significant increase in the methylation level of two lncRNA genes: *SNHG6* ( $p = 0.044$ ) and *SNHG12* ( $p = 0.006$ ). Peritoneal dissemination was associated with hypermethylation of four lncRNA genes: *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472* ( $p < 0.05$ ), and most significantly *TINCR* ( $p = 0.001$ ). *GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00886* ( $p < 0.05$ ) and most significantly *LINC00472* ( $p < 0.001$ ) hypermethylation was typical for omental metastasis, and that of *LINC00472* and *LINC00886*, with ascites ( $p < 0.05$ ). Peritoneal macroscopic metastases demonstrated increased methylation of *MAFG-DT* ( $p < 0.001$ ) and *TP53TG1* ( $p < 0.001$ ) and desmethylation of *LINC00886*

( $p = 0.003$ ) and *SNHG12* ( $p = 0.002$ ), compared to their primary tumors.

**Conclusion:** We performed the analysis of clinical significance of 13 hypermethylated lncRNA genes in ovarian cancer and were the first to show that 10 genes (*GAS5*, *HOTAIR*, *LINC00472*, *LINC00886*, *MAFG-DT*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, *TP53TG1*, *TUG1*) were associated with various types of ovarian tumor metastasis. Also, we were able to determine certain panels of lncRNA, which, if demonstrate abnormal methylation, were specific for lymphogenous and peritoneal metastasis of ovarian tumors.

**Key words:** ovarian cancer, peritoneal metastasis, omentum, ascites, non-coding RNA, regulatory factor

**For citation:** Burdenny AM, Lukina SS, Filippova EA, Ivanova NA, Pronina IV, Loginov VI, Kazubskaya TP, Kushlinskiy DN, Tsekatonov DA, Zhordania KI, Braga EA. The group of hypermethylated long noncoding RNA genes is associated with different types of metastasis in ovarian cancer. Almanac of Clinical Medicine. 2024; 52(3):149–161. doi: 10.18786/2072-0505-2024-52-021.

Received 25 March 2024; revised 23 April 2024; accepted 20 August 2024; published online 4 September 2024



- cancer. *Genome Med.* 2015;7:108. doi: 10.1186/s13073-015-0233-4.
28. Tsai KW, Tsai CY, Chou NH. et al. Aberrant DNA hypermethylation silenced lncRNA expression in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2019;39(10):5381–5391. doi: 10.21873/anticancer.13732.
29. Shao G, Fan X, Zhang P, Liu X, Huang L, Ji S. Methylation-dependent MCM6 repression induced by LINC00472 inhibits triple-negative breast cancer metastasis by disturbing the MEK/ERK signaling pathway. *Aging (Albany NY).* 2021;13(4):4962–4975. doi: 10.18632/aging.103568.
30. Lan L, Cao H, Chi W. et al. Aberrant DNA hypermethylation-silenced LINC00886 gene accelerates malignant progression of laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2020;216(4):152877. doi: 10.1016/j.prp.2020.152877.
31. Dong Z, Yang L, Lu J. et al. Downregulation of LINC00886 facilitates epithelial-mesenchymal transition through SIRT7/ELF3/miR-144 pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2022;39(4):661–677. doi: 10.1007/s10585-022-10171-w.
32. Azman AA, Siok-Fong C, Rajab NF, Md Zin RR, Ahmad Daud NN, Mohamad Hanif EA. The potential roles of lncRNA TINCR in triple negative breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2023;50(9):7909–7917. doi: 10.1007/s11033-023-08661-5.
33. Ghafouri-Fard S, Dashti S, Taheri M, Omrani MD. TINCR: An lncRNA with dual functions in the carcinogenesis process. *Noncoding RNA Res.* 2020;5(3):109–115. doi: 10.1016/j.ncrna.2020.06.003.
34. Bai Y, Ren C, Wang B, Xue J, Li F, Liu J, Yang L. lncRNA MAFG-AS1 promotes the malignant phenotype of ovarian cancer by upregulating NFKB1-dependent IGF1. *Cancer Gene Ther.* 2022;29(3–4):277–291. doi: 10.1038/s41417-021-00306-8.
35. Cheng Y, Huang N, Yin Q, Cheng C, Chen D, Gong C, Xiong H, Zhao J, Wang J, Li X, Zhang J, Mao S, Qin K. lncRNA TP53TG1 plays an anti-oncogenic role in cervical cancer by synthetically regulating transcriptome profile in HeLa cells. *Front Genet.* 2022;13:981030. doi: 10.3389/fgene.2022.981030.
36. Chen B, Lan J, Xiao Y, Liu P, Guo D, Gu Y, Song Y, Zhong Q, Ma D, Lei P, Liu Q. Long noncoding RNA TP53TG1 suppresses the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating the PRDX4/β-catenin pathway. *Cancer Lett.* 2021;513:75–89. doi: 10.1016/j.canlet.2021.04.022.
37. Fang D, Ou X, Sun K, Zhou X, Li Y, Shi P, Zhao Z, He Y, Peng J, Xu J. m6A modification-mediated lncRNA TP53TG1 inhibits gastric cancer progression by regulating CIP2A stability. *Cancer Sci.* 2022;113(12):4135–4150. doi: 10.1111/cas.15581.

#### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

#### Authors' contribution

A.M. Burdenny, the study design, selection of primers, experimental studies, text editing; S.S. Lukina, experimental studies, statistical analysis, text editing; E.A. Filippova, statistical analysis, preparation of tables and illustrations, discussion of the results, text editing; N.A. Ivanova, experimental studies, data analysis, discussion of the results and editing of the manuscript; I.V. Pronina, experimental studies, participation in the analysis of literature and discussion of the results, text editing; V.I. Loginov, collection and analysis of clinical sample characteristics, selection of primers, text editing; T.P. Kazubskaya, collection and characterization of clinical samples, participation in the discussion of the results, text editing; D.N. Kushlinskiy, patient management, analysis of medical files, participation in the correlation of the results with clinical patient characteristics, discussion of the results, text editing; D.A. Tsekatonov, morphological studies of the tumors, discussion of the results, correlation of the results with morphological tumor characteristics, text editing; K.I. Zhordania, collection and characterization of clinical samples, discussion of the results, text editing; E.A. Braga, the study design, literature analysis, text writing and final editing. All the authors have read and approved the final version of the paper before submission, agreed to be responsible for all aspects of the study and ensure that they have properly considered and solved all issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

**Alexey M. Burdenny** – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; Junior Research Fellow, Laboratory of Chemical Physics of Bioanalytical Processes<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>.  
✉ Ul. Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315, Russian Federation. E-mail: burdenny@gmail.com

**Svetlana S. Lukina** – Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>.  
E-mail: sveta\_sergeevna349@mail.ru

**Elena A. Filippova** – PhD, Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>.  
E-mail: p.lenyxa@yandex.ru

**Natalya A. Ivanova** – Junior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3314-6183>.  
E-mail: nata-i@list.ru

**Irina V. Pronina** – Cand. of Biol. Sci., Senior Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>. E-mail: zolly\_sten@mail.ru

**Vitaly I. Loginov** – Cand. of Biol. Sci., Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; Senior Research Fellow<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>.  
E-mail: loginov7w@gmail.com

**Tatyana P. Kazubskaya** – MD, PhD, Oncogeneticist, Senior Research Fellow, Laboratory of Clinical Oncogenetics<sup>4</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>. E-mail: oncogen5@ronc.ru

**Dmitry N. Kushlinskiy** – PhD, Associate Professor, Chair of Oncology and Pathomorphological Disciplines<sup>5</sup>; Head of the Department of Gynecological Oncology<sup>6</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1490-8418>.  
E-mail: drkushlinskiy@gmail.com

**Dmitry A. Tsekatonov** – MD, Pathologist, Head of the Department of Pathological Anatomy<sup>7</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1561-9681>.  
E-mail: mtsekatonov@inbox.ru

**Kirill I. Zhordania** – MD, PhD, Professor, Leading Research Fellow, Department of Gynecological Oncology<sup>8</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3710>.  
E-mail: kiazoz2@yandex.ru

**Eleonora A. Braga** – Doctor of Biol. Sci., Professor, Head of Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; Leading Research Fellow<sup>3</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>.  
✉ Ul. Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315, Russian Federation. E-mail: eleonora10\_45@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology; ul. Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315, Russian Federation

<sup>2</sup>N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics; ul. Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russian Federation

<sup>3</sup>Research Centre for Medical Genetics; ul. Moskvorechye, 1, Moscow, 115522, Russian Federation

<sup>4</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoye shosse, 24, Moscow, 115522, Russian Federation

<sup>5</sup>Institute for Advanced Training of Healthcare Specialists Ministry of Health of the Khabarovsk Territory; ul. Krasnodarskaya, 9, Khabarovsk, 680009, Russian Federation

<sup>6</sup>Regional Clinical Center of Oncology Ministry of Health of the Khabarovsk Territory; 680042, Khabarovsk, Voronezhskoe shosse, 164, Russian Federation