



Оригинальная статья

# Клинические особенности метилирования генов микроРНК в пограничных опухолях яичников и в зависимости от гистологического строения злокачественных опухолей яичников

Лукина С.С.<sup>1</sup> • Бурденный А.М.<sup>1</sup> • Филиппова Е.А.<sup>1</sup> • Пронина И.В.<sup>1</sup> • Казубская Т.П.<sup>2</sup> • Кушлинский Д.Н.<sup>2</sup> • Уткин Д.О.<sup>3</sup> • Брага Э.А.<sup>1</sup> • Логинов В.И.<sup>1</sup> • Кушлинский Н.Е.<sup>2</sup>

**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

**Бурденный Алексей Михайлович** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>. E-mail: burdennyu@gmail.com

**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

**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

**Казубская Татьяна Павловна** – д-р мед. наук, врач-онкогенетик высшей категории, ст. науч. сотр. лаборатории клинической онкогенетики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>. E-mail: oncogen5@ronc.ru

**Кушлинский Дмитрий Николаевич** – врач-онколог, лаборатория клинической биохимии и лабораторной диагностики<sup>2</sup>. E-mail: biochimia@yandex.ru

**Уткин Дмитрий Олегович** – врач-хирург первой квалификационной категории, отделение онкогинекологии<sup>3</sup>. E-mail: burdennyu@gmail.com

**Брага Элеонора Александровна** – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотр., заведующая лабораторией патогеномики и транскриптомики<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

✉ 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8, Российская Федерация. Тел.: +7 (917) 545 43 93. E-mail: eleonora10\_45@mail.ru

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

**Кушлинский Николай Евгеньевич** – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии и лабораторной диагностики<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: biochimia@yandex.ru

**Обоснование.** Пограничные опухоли яичников (ПОЯ) представляют собой промежуточный тип между доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников. Серозные пограничные опухоли имеют общие молекулярные и генетические особенности с серозными карциномами. Ранее было показано повышение уровня метилирования группы генов микроРНК (миРНК) при развитии и прогрессии рака яичников. Однако результаты исследований противоречивы, а их количество недостаточно для формирования единого мнения. В данной работе впервые проведен поиск aberrантно метилированных генов миРНК, специфичных для ПОЯ и некоторых гистологических подтипов рака яичников.

**Материал и методы.** В исследовании использовали выборку из 99 парных (опухоль/норма) образцов опухолей яичников. Анализ метилирования проводился с применением метода количественной метилспецифичной полимеразной цепной реакции. Скрининг биомаркеров ПОЯ выполнен среди 21 гена миРНК.

**Результаты.** Мы обнаружили, что некоторые гены миРНК (*MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR193A*, *MIR203A*, *MIR107*, *MIR1258*, *MIR339*) характеризовались высоким уровнем метилирования в группе больных ПОЯ в сравнении с тканями здоровых женщин. При этом в группе больных злокачественными опухолями яичников (ЗОЯ) уровень их метилирования либо отличался незначительно, либо даже снижался. Для генов *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR203*, *MIR107* и *MIR1258* выявлен более высокий уровень метилирования в образцах больных ПОЯ в сравнении с образцами больных ЗОЯ.

Уровень метилирования гена *MIR148A* в ПОЯ был в 4 раза выше, чем в ЗОЯ (31,3% против 7,9%,  $p=0,047$ , множественный двусторонний тест Краскела – Уоллиса). Уровни метилирования генов миРНК *MIR148A* и *MIR191* статистически значимо снижены в серозной цистаденокарциноме и повышены в серозной и эндометриодной аденокарциномах.

**Заключение.** Метилирование генов миРНК *MIR148A* и *MIR191* связано с различными гистологическими вариантами рака яичников. Показан повышенный уровень метилирования ряда генов миРНК в ПОЯ в сравнении с ЗОЯ. В целом отмечено влияние эпигенетических факторов на клинические различия гистологических форм рака яичников и пограничной формы.

**Ключевые слова:** пограничные опухоли яичников, злокачественные опухоли яичников, гистологический тип рака яичников, метилирование генов микроРНК, ген *MIR148A*

**Для цитирования:** Лукина СС, Бурденный АМ, Филиппова ЕА, Пронина ИВ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Уткин ДО, Брага ЭА, Логинов ВИ, Кушлинский НЕ. Клинические особенности метилирования генов микроРНК в пограничных опухолях яичников и в зависимости от гистологического строения злокачественных опухолей яичников. Альманах клинической медицины. 2022;50. doi: 10.18786/2072-0505-2022-50-001.

Поступила 29.10.2021; доработана 10.11.2021; принята к публикации 12.11.2021; опубликована онлайн 17.02.2022

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

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 23, Российская Федерация

<sup>3</sup> ГБУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 ДЗМ»; 143423, Красногорский район, пос. Истра, 27, Российская Федерация



**К**пограничным опухолям яичников (ПОЯ), также известным как атипически пролиферирующие опухоли, относят новообразования, которые характеризуются атипичной эпителиальной пролиферацией и не имеют инвазии в строму. Данный тип опухоли в большинстве случаев имеет благоприятный прогноз и редко склонен к злокачественной трансформации [1, 2]. Из всех эпителиальных новообразований яичников на ПОЯ приходится 15–20%. К наиболее распространенным типам ПОЯ относятся серозные (53%) и муцинозные (43%). Другие типы, в том числе пограничные эндометриоидные, светлоклеточные и опухоли Бреннера, обнаруживают лишь в 4% наблюдений [3]. Серозные ПОЯ имеют общие молекулярные и генетические черты с серозными карциномами низкой степени злокачественности и могут присутствовать на более тяжелых стадиях рака с перитонеальными имплантатами и/или поражением лимфатических узлов, что подтверждает их злокачественный потенциал. ПОЯ так называемых несерозных гистологических типов, к которым относятся муцинозные, эндометриоидные, светлоклеточные и Бреннера, обычно характеризуются односторонней локализацией без имплантации в перитонеальное пространство и благоприятным прогнозом [2–4].

К настоящему времени накоплена обширная информация о влиянии аномальной экспрессии микроРНК (миРНК) на развитие и прогрессию рака яичников. Однако имеются ограниченные данные о дифференциальном паттерне этой экспрессии, связанном с гистологическими типами рака яичников, и единичные сообщения о паттерне экспрессии миРНК и в доброкачественных опухолях яичников, и в пограничных [5–7]. Так, миРНК, специфичные для ПОЯ, были наиболее подробно изучены в работе [5], где экспрессия 4 миРНК (miR-30c, miR-30d, miR-30e-3p, miR-370) значительно различалась между карциномами и доброкачественными опухолями яичников, а также между карциномой и пограничными опухолями. Еще 3 миРНК (miR-181d, miR-30a-3p, miR-532-5p) значительно различались только между ПОЯ и карциномами. Экспрессия miR-532-5p была существенно ниже в пограничных опухолях, чем в доброкачественных. Среди карцином яичников экспрессия 4 миРНК (miR-30a-3p, miR-30c, miR-30d, miR-30e-3p) была самой низкой в муцинозной и самой высокой в образцах светлоклеточной карциномы. В работе [8] обнаружено, что экспрессия miR-106b, напротив, значительно выше в нормальных тканях яичников

и доброкачественных опухолях, чем в карциномах яичников и пограничных опухолях ( $p < 0,01$ ). Коллективом авторов [9] проведен анализ экзосомных миРНК в сыворотке 68 новообразований яичников, включая доброкачественные кисты яичников ( $n = 10$ ), ПОЯ ( $n = 10$ ), серозные карциномы яичников высокой ( $n = 39$ ) и низкой ( $n = 9$ ) степени дифференцировки, что позволило отобрать экзосомные миРНК miR-93, miR-145 и miR-200c со значимо повышенным уровнем экспрессии в сыворотке больных раком яичников. Сывороточные экзосомальные miR-145 и miR-200c отобраны как биомаркеры для предоперационной диагностики карцином яичников [9].

Отмечено, что промоторные CpG-островки генов миРНК aberrантно метилируются, подобно генам, кодирующим белок, и что процент генов, deregулируемых с помощью aberrантного метилирования, значительно выше среди первых генов, чем среди вторых [10]. Ранее нами показана высокая эффективность анализа метилирования генов миРНК для оценки степени развития и прогрессии рака яичников и определены наборы маркеров для диагностики и прогноза рака яичников [11–13]. В данной работе впервые проведен поиск aberrантно метилированных генов миРНК, специфичных для ПОЯ и некоторых гистологических подтипов рака яичников. Скрининг биомаркеров ПОЯ выполнен среди 21 гена миРНК.

## Материал и методы

### Клинический материал

Образцы рака яичников собраны и морфологически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследование включено 93 больных злокачественными опухолями яичников (ЗОЯ) в возрасте 25–81 года, а также 6 больных ПОЯ в возрасте 14–39 лет, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 1995 по 2019 г. Использовали материал от пациенток, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Диагноз установлен на основании гистологического заключения. В качестве контроля взяты образцы ткани яичников 15 женщин, умерших без признаков онкологических заболеваний по данным анамнеза.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004), все пациенты подписали информированное добровольное согласие. Все опухоли яичников классифицированы в соответствии



с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации Всемирной организации здравоохранения [14]. Исследование выполнено по международным правилам работы с биоматериалом людей. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» получено соглашение от 20.01.2020 № 20/1 о взаимном сотрудничестве с ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В табл. 1 приведены количественные данные по гистологическому составу ЗОЯ всех исследованных образцов. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. Образцы тканей хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Методы

Полученные в ходе биопсии или оперативного вмешательства образцы объемом до  $100\text{ мм}^3$  измельчали с использованием гомогенизатора-диспергатора Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Германия). Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. Качество и концентрацию ДНК определяли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Уровень метилирования генов миРНК анализировали методом количественной метилспецифичной полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени с применением бисульфитной конверсии ДНК (0,5–2,0 мкг), как описано в работах [15–18]. Набор реактивов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию проводили в системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) по протоколу производителя. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения полимеразной цепной реакции для исследованных генов миРНК взяты из работ [12, 16, 19]. Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса гена *ACTB* с применением олигонуклеотидов, специфичных к неконвертированной матрице [16]. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (Promega, США). В качестве положительного контроля 100%-го метилирования применяли коммерческий препарат ДНК #SD1131 (Thermo Fisher Scientific).

**Таблица 1.** Распределение больных злокачественными опухолями яичников в зависимости от гистологического варианта строения опухоли

Гистологический вариант	Частота, абс. (%)
Серозная аденокарцинома	44 (47,3)
Серозная цистаденокарцинома	38 (40,9)
Муцинозная цистаденокарцинома	1 (1,0)
Эндометриоидная аденокарцинома	10 (10,8)

Для статистической обработки полученных данных использовали программы IBM SPSS Statistics 22 и STATISTICA 10. Она включала определение медианы (Me), интерквартильного размаха [Q1; Q3] и минимального и максимального значений (min–max). Для оценки статистической значимости различий применялись непараметрические критерии Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Гены микроРНК, специфично гиперметилированные в пограничных опухолях яичников

В табл. 2 обобщены результаты анализа метилирования 21 гена миРНК в образцах ПОЯ, ЗОЯ и группы контроля. Оказалось, что уровни метилирования 8 генов миРНК, а именно *MIR124-2*, *MIR124-3*, *MIR127*, *MIR137*, *MIR375*, *MIR9-1*, *MIR9-3*, *MIR130B*, были выше в группе ЗОЯ в сравнении с группой ПОЯ и группой контроля (рис. 1). Интересно, что значения медиан 6 других генов – *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR203*, *MIR107* и *MIR1258* – были, наоборот, выше в группе ПОЯ, чем ЗОЯ (см. табл. 2). При этом различия в уровнях метилирования гена *MIR148A* в группах ПОЯ и ЗОЯ статистически значимы ( $p = 0,047$ , рис. 2, см. табл. 2), а в группах больных ЗОЯ и контроля – незначимы (7,9 против 5,0). На основании этих данных можно предположить специфическую роль гена *MIR148A* в развитии ПОЯ.

При сравнении группы контроля и больных ПОЯ статистически значимые различия установлены для 7 из 21 изучаемого гена ( $p < 0,05$ , рис. 3). Отметим: 10 генов миРНК (*MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR193A*, *MIR203A*, *MIR107*, *MIR1258*, *MIR339*) характеризовались высоким уровнем метилирования в опухолях больных ПОЯ в сравнении с тканями яичников здоровых женщин, в отсутствие значимого изменения в группе больных ЗОЯ (рис. 4).

**Таблица 2.** Данные анализа метилирования генов микроРНК в образцах ткани яичников разных групп больных и группы контроля

Ген <i>MIR</i>	Метилирование в ткани яичников, Me [Q1; Q3], min-max, %			Значение <i>p</i> * (FDR=0,01)
	Контроль (n=15)	Ткань опухоли яичников		
		ПОЯ (n=6)	ЗОЯ (n=93)	
124-1	0,5 [0,2; 3,1], 0,1–9,2	14,0 [8,9; 24,0], 8,8–45,0	10,0 [2,6; 21,6], 0–67,3	$p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-1} = 0,003$
124-2	7,4 [0,2; 13,1], 0,1–19,5	19,0 [11,0; 36,5], 6,4–92,3	29,0 [6,8; 51,7], 0–98,1	$p_{0-2} = 0,0017$
124-3	4,7 [0,3; 8,9], 0,1–17,8	16,8 [12,7; 30,9], 9,6–34,6	21,4 [8,5; 41,7], 0,04–95,3	$p_{0-2} < 0,0001$
125B-1	5,6 [1,6; 11,4], 1,1–16,2	36,6 [1,5; 75,1], 0,4–97,3	34,8 [11,2; 60,6], 0,1–99,3	$p_{0-2} < 0,0001$
127	8,8 [0,9; 11,1]; 0,2–18,8	12,7 [1,6; 20,4], 1,0–31,0	27,6 [4,8; 53,9], 0,08–93,3	$p_{0-2} < 0,001$
129-2**	8,2 [4,9; 11,2], 4,3–13,3	51,6 [12,7; 87,4], 2,1–89,0	31,2 [10,3; 51,5], 0,3–99,3	$p_{0-2} < 0,001$ $p_{0-1} = 0,036$
132**	1,3 [0,1; 4,3], 0,1–9,0	25,6 [7,6; 47,2], 0,2–62,5	9,8 [3,6; 31,9], 0,05–98,8	$p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-1} = 0,008$
137	7,5 [2,9; 10,0], 0,3–13,2	22,9 [1,8–76,7], 1,0–90,0	31,1 [2,5; 56,9], 0–98,5	$p_{0-2} = 0,018$
148A**	5,0 [3,0; 10,9], 0,1–13,6	31,3 [25,0; 50,0], 9,9–90,8	7,9 [1,9; 28,7], 0–94,4	$p_{0-1} = 0,018$ $p_{1-2} = 0,047$
191	28,5 [13,8; 32,9], 8,6–94,4	4,8 [1,8; 22,2], 1,7–33,8	7,0 [2,4; 25,8], 0,01–90,7	$p_{0-2} = 0,006$
193A	4,5 [0,3; 7,3], 0,1–12,2	32,1 [8,5; 38,3], 0,1–53,1	34,8 [15,4; 56,4], 0,1–98,4	$p_{0-2} < 0,0001$
203**	6,9 [0,9; 9,9], 0,1–15,2	13,8 [0,6; 74,5], 0,2–90,9	6,8 [1,3; 35,3], 0,01–98,2	–
212	4,6 [1,6; 8,3], 0,2–13,9	5,9 [0,4; 17,8], 0,03–70,5	4,8 [1,5; 12,6], 0,02–98,2	–
34B/C	0,9 [0,4; 1,7], 0,1–7,7	21,3 [11,4; 27,4], 3,7–76,2	17,6 [3,1; 35,4], 0,01–98,1	$p_{0-2} < 0,0001$ $p_{0-1} = 0,005$
375	1,0 [0,2; 2,8], 0,1–9,1	7,8 [2,2; 15,0], 0,01–28,2	10,9 [3,2; 34,2], 0–92,5	$p_{0-2} < 0,001$
9-1	2,0 [1,4; 4,0], 0,1–8,8	7,3 [4,0; 10,0], 0,05–94,6	24,4 [7,7; 56,3], 0,01–93,6	$p_{0-2} < 0,0001$
9-3	7,4 [5,2; 14,9], 0–18,0	10,7 [5,4; 24,8], 2,1–36,5	21,9 [7,2; 36,4], 0,02–98,3	$p_{0-2} = 0,014$
130B	1,6 [0,3; 2,9], 0–7,2	7,8 [1,6; 28,2], 1,4–91,4	16,9 [6,8; 32,5], 0,1–99,1	$p_{0-2} < 0,0001$
107**	7,2 [2,4; 10,2], 1,6–17,4	26,1 [18,2; 31,1], 3,5–92,3	15,7 [6,2; 53,5], 0–93,0	$p_{0-2} = 0,024$
1258**	1,0 [0,3; 12,2], 0,2–14,1	35,6 [17,0; 62,2], 4,2–70,2	11,2 [4,4; 40,8], 0,1–90,8	$p_{0-2} < 0,001$ $p_{0-1} = 0,002$
339	7,9 [3,2; 9,4], 1,2–11,8	23,6 [9,2; 48,1], 8,2–99,9	21,2 [8,2; 54,3], 0,2–99,7	$p_{0-2} < 0,001$ $p_{0-1} = 0,009$

FDR – false discovery rate, ожидаемая доля ложных отклонений, ЗОЯ – злокачественные опухоли яичников; ПОЯ – пограничные опухоли яичников

 $p_{0-1}$  – различия между группой контроля и группой больных ПОЯ,  $p_{0-2}$  – различия между группой контроля и группой больных ЗОЯ,  $p_{1-2}$  – различия между группой больных ПОЯ и группой больных ЗОЯ

\* Представлены только статистически значимые различия

\*\* Гены, у которых значения медиан существенно выше в ПОЯ, чем в ЗОЯ

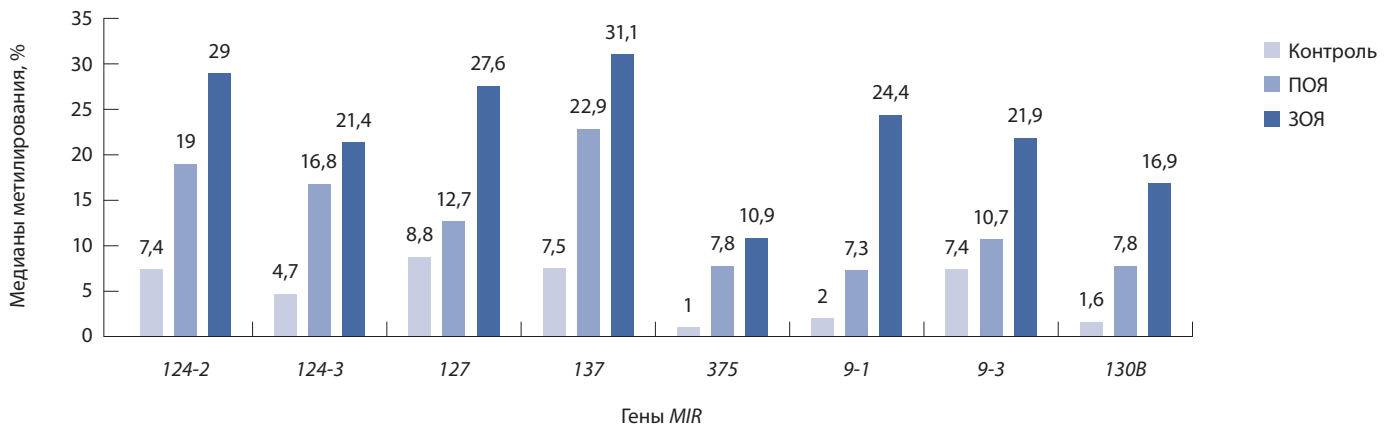


Рис. 1. Медианы уровней метилирования 8 генов миРНК в группе больных злокачественными опухолями яичников (ЗОЯ) в сравнении с больными с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) и группой контроля

Наиболее существенное повышение (в 1,5–4 раза) уровня метилирования в образцах больных ПОЯ в сравнении с образцами больных ЗОЯ отмечено для 6 генов миРНК: *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR203*, *MIR107* и *MIR1258* (см. табл. 2, рис. 4), что указывает на специфичную вовлеченность этих миРНК в патогенез ПОЯ. Повышенное метилирование данных супрессорных генов снижает их экспрессию и может увеличивать злокачественный потенциал ПОЯ.

Подобные попытки изучения статуса метилирования предпринимались и ранее при исследовании белок-кодирующих генов при раке яичников [20–22]. При этом существенных различий в статусе метилирования генов, кодирующих белки, в группах ПОЯ и ЗОЯ выявлено не было. Вместе с тем на данный момент нет ни одной публикации, в которой выполнен количественный анализ уровня метилирования миРНК в группах ПОЯ и ЗОЯ (поиск велся по базе PubMed, дата обращения: 14.10.2021). Наши результаты, свидетельствующие о существенно повышенном метилировании 6 генов миРНК (*MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR203*, *MIR107* и *MIR1258*, при этом различия в уровнях метилирования гена *MIR148A* статистически значимы) в группе ПОЯ, получены впервые. Таким образом, нами выявлены новые эпигенетические факторы, которые могут оказывать влияние на развитие и степень злокачественности ПОЯ и служить их биомаркерами. Обнаруженные нами новые эпигенетические регуляторные факторы и биомаркеры ПОЯ могут найти применение для целей диагностики и профилактики рака яичников. Эти данные могут быть использованы в клинике как критерии течения болезни и, как следствие, для изменения тактики лечения.

Сравнение уровней метилирования генов миРНК в злокачественных опухолях яичников в зависимости от гистологического типа опухоли. Проведено сравнение уровней метилирования 21 гена миРНК в опухолях яичников 4 гистологических типов: серозная аденокарцинома, серозная цистаденокарцинома, муцинозная цистаденокарцинома и эндометриодная аденокарцинома (табл. 3).

Наша выборка образцов представлена в основном серозной аденокарциномой (44 образца, 47,3%) и серозной цистаденокарциномой (38 образцов, 40,9%), которые составляют в сумме 82% исследованных ЗОЯ. Другие гистотипы присутствуют в меньшем количестве. Метилирование большинства генов распределено случайным образом между четырьмя гистологическими типами ЗОЯ, однако метилирование двух генов миРНК – *MIR148A* и *MIR191* – имеет особенности и значимо связано

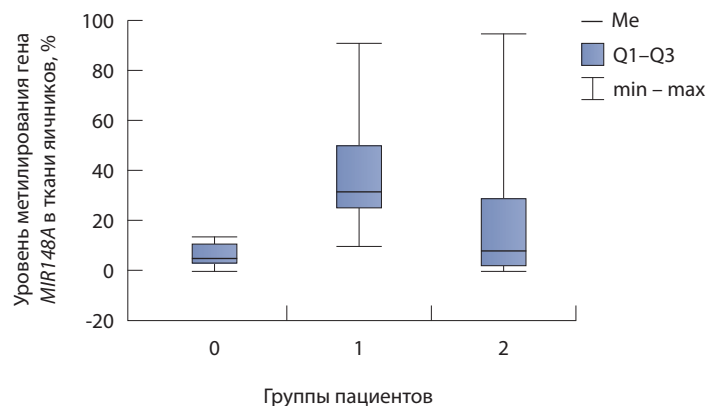


Рис. 2. Уровни метилирования гена *MIR148A* в ткани яичников в группе контроля (0), группе больных пограничными опухолями яичников (1) и группе больных злокачественными опухолями яичников (2)



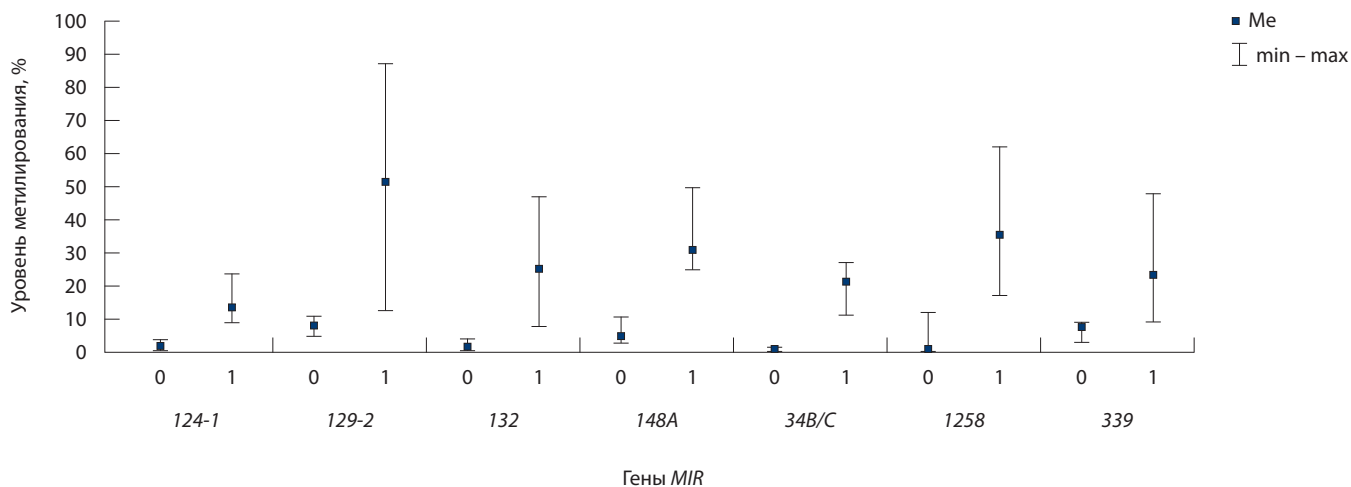


Рис. 3. Медианы и квартили уровней метилирования ряда генов в группе контроля (0) и группе больных пограничными опухолями яичников (1)

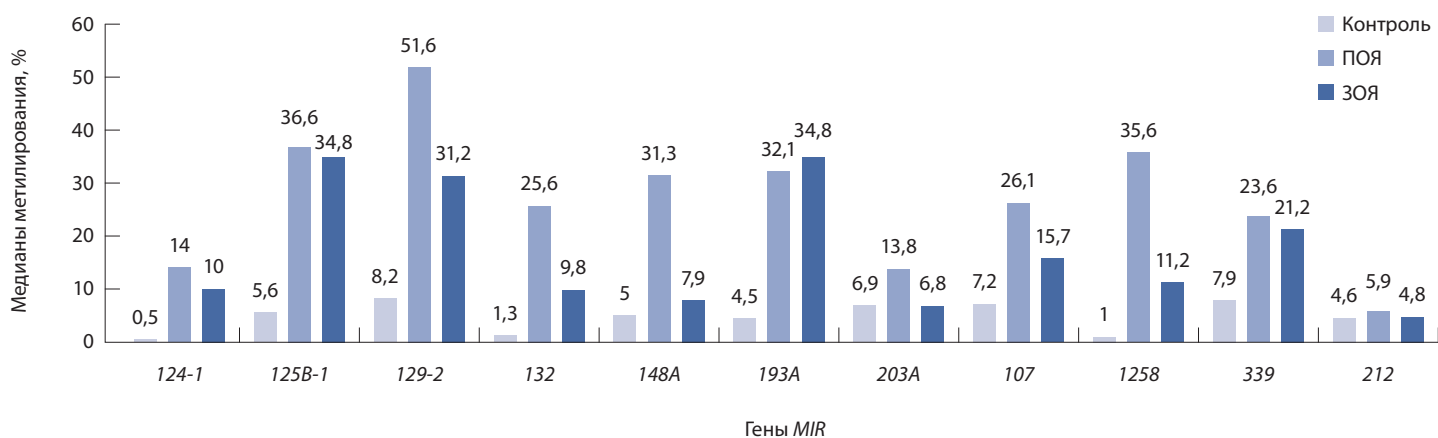


Рис. 4. Повышенные уровни метилирования 10 генов микроРНК в группе больных пограничными опухолями яичников (ПОЯ) в сравнении как с группой контроля, так и с группой больных злокачественными опухолями яичников (ЗОЯ) (кроме *MIR193A*)

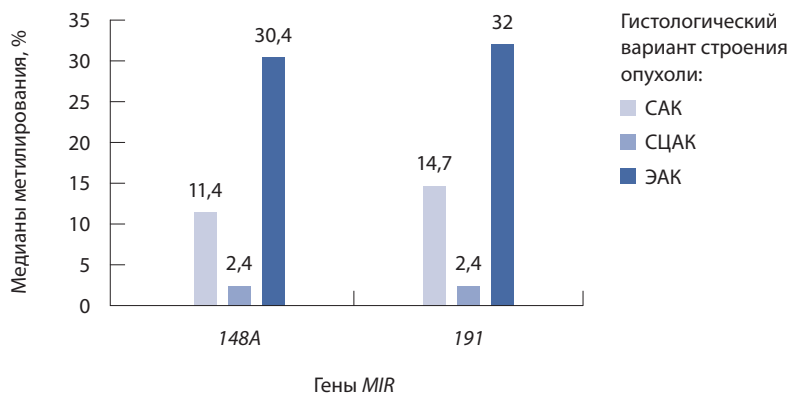


Рис. 5. Медианы метилирования генов микроРНК в ткани опухоли больных раком яичников, значимо связанных с гистологическим вариантом строения опухоли; САК – серозная аденокарцинома, СЦАК – серозная цистаденокарцинома, ЭАК – эндометриоидная аденокарцинома

со специфичными гистологическими вариантами рака яичников. Так, уровень метилирования гена *MIR148A* в группе больных серозной цистаденокарциномой статистически значимо меньше (2,4%) по сравнению как с вариантом серозной аденокарциномы (11,4%,  $p=0,0003$ ), так и с вариантом эндометриоидной аденокарциномы (30,4%,  $p=0,0011$ , рис. 5). Аналогичная закономерность получена и при сравнении медиан метилирования гена *MIR191*. Так, в группе больных с вариантом серозной цистаденокарциномы медиана метилирования была статистически значимо меньше (2,4%) по сравнению с группами пациенток как с серозной аденокарциномой (14,7%,  $p=0,0002$ ), так и с эндометриоидной аденокарциномой (32%,  $p=0,0003$ , см. рис. 5). У этих двух генов – *MIR148A* и *MIR191* – втрое возрастает уровень



**Таблица 3.** Метилирование группы генов миРНК в образцах злокачественных опухолей яичников в зависимости от гистологического варианта строения опухоли

Ген <i>MIR</i>	Метилирование в опухолевой ткани яичников, Ме [Q1; Q3], %			
	Гистологический вариант строения опухоли			
	САК (n=44)	СЦАК (n=38)	ЭАК (n=10)	МЦАК (n=1)
124-1	11,4 [3,3; 21,0]	10,0 [2,6; 30,0]	3,8 [0,4; 21,2]	2,1
124-2	42,0 [7,2; 66,7]	21,2 [6,8; 37,2]	11,7 [3,0; 41,2]	0
124-3	21,3 [11,9; 35,8]	18,8 [4,8; 50,3]	28,8 [8,6; 39,8]	52,7
125B-1	32,8 [11,2; 57,6]	35,5 [13,0; 69,1]	33,4 [11,2; 85,0]	7,1
127	35,9 [5,1; 56,1]	18,8 [3,9; 45,0]	34,5 [18,2; 45,1]	54,3
129-2	32,1 [7,6; 46,6]	39,4 [12,5; 84,3]	23,0 [15,2; 31,2]	2,9
132	9,4 [4,5; 16,9]	11,5 [3,6; 57,3]	11,7 [1,9; 35,3]	0,1
137	36,6 [8,0; 53,1]	33,3 [2,0; 60,1]	12,7 [1,0; 64,4]	2,3
148A*	11,4 [5,9; 34,9]	2,4 [1,1; 10,1]	30,4 [7,2; 45,8]	1,9
191*	14,7 [4,9; 28,8]	2,4 [0,7; 7,0]	32,0 [11,2; 42,0]	21,3
193A	27,6 [14,5; 54,3]	42,3 [9,0; 59,7]	38,7 [24,9; 66,4]	34,6
203A	6,1 [0,9; 33,7]	10,3 [2,6; 40,9]	3,0 [1,0; 37,6]	1,3
212	8,7 [1,6; 13,6]	2,9 [1,1; 7,4]	9,5 [0,5; 31,1]	2,6
34B/C	12,7 [3,8; 29,8]	23,1 [2,3; 49,2]	11,2 [1,3; 15,7]	31,3
375	9,8 [0,5; 36,7]	11,3 [4,3; 37,6]	10,8 [8,1; 18,0]	1,6
9-1	25,6 [10,6; 53,8]	38,2 [3,0; 63,6]	20,0 [2,2; 24,2]	2,0
9-3**	15,8 [5,9; 23,9]	31,3 [13,5; 52,2]	16,0 [4,6; 45,1]	3,1
130B	16,1 [7,3; 23,9]	22,2 [6,8; 48,2]	15,1 [4,5; 39,0]	1,9
107	10,5 [5,8; 56,9]	22,2 [6,2; 44,5]	26,3 [8,3; 59,2]	2,7
1258**	8,2 [3,9; 27,2]	25,1 [7,1; 56,2]	5,0 [3,5; 8,0]	27,2
339	18,7 [2,7; 49,3]	21,1 [11,2; 59,1]	22,0 [12,0; 26,5]	44,6

МЦАК – муцинозная цистаденокарцинома, САК – серозная аденокарцинома, СЦАК – серозная цистаденокарцинома, ЭАК – эндометриодная аденокарцинома

\*  $p < 0,001$ , FDR (false discovery rate, ожидаемая доля ложных отклонений) = 0,01

\*\*  $p < 0,05$ , FDR (false discovery rate, ожидаемая доля ложных отклонений) = 0,01

метилирования у больных эндометриодной аденокарциномой (приблизительно от 10 до 30%).

Ген *MIR191* подвергается в ЗОЯ деметилированию, то есть проявляет онкогенные свойства, что принципиально отличает его от остальных исследованных нами генов миРНК, гиперметилированных в ЗОЯ.

На основании наших результатов, в том числе особенностей, выявленных для гена *MIR148A*, можно предположить его двойственную природу.

Под этим следует понимать тканеспецифичность данного гена и его способность быть как онкогеном, провоцируя развитие опухоли, так и супрессором, соответственно, подавляя ее. В этом свете интересной представляется роль метилирования как механизма дерегуляции данной миРНК, который может обуславливать ее двойственную природу.

Интересно отметить, что у гена *MIR148A* выше уровень метилирования у больных с серозной



и эндометриоидной аденокарциномой, но этот ген значимо деметилирован в опухолях больных с серозной цистаденокарциномой. При этом именно ген *MIR148A* показал статистически значимо более высокий уровень метилирования в ПОЯ. Ранее для этого гена нами также выявлено резкое повышение метилирования при колонизации вторичных опухолей, перитонеальных макроскопических метастазов рака яичников [23]. Как известно, в процессах метастазирования наибольшее значение имеет эпителиально-мезенхимальный переход. Однако при закреплении метастатических клеток в метастатической нише может происходить обратный мезенхимально-эпителиальный переход. Эти переходы могут быть обратимы, и наибольшая пластичность отмечена при метастазировании именно рака яичников [24, 25].

В свете представленных здесь результатов важно, что в регуляции процессов обратимых эпителиально-мезенхимального – мезенхимально-эпителиального переходов и их пластичности ключевая роль отводится эпигенетическим факторам [26, 27]. При этом среди данных факторов важное значение в регуляции биологических процессов, связанных с перепрограммированием клеток опухолей яичников, могут иметь некодирующие РНК, в частности миРНК, и метилирование генов миРНК [12, 28]. С этой концепцией согласуется и открытый нами недавно эффект снижения гиперметилирования ряда генов

длинных некодирующих РНК в перитонеальных макроскопических метастазах рака яичников, что также указывает на значение aberrантного метилирования длинных некодирующих РНК как эпигенетического фактора в реверсии эпителиально-мезенхимальный – мезенхимально-эпителиальный переходы при колонизации метастазов рака яичников в брюшине [29].

Обнаруженные в данной работе гиперметилирование генов миРНК в группе ПОЯ и различия уровней метилирования генов миРНК в гистологических вариантах ЗОЯ также указывают на потенциальную регуляторную роль эпигенетических факторов в биологических процессах, определяющих перепрограммирование клеток яичников, а также на вовлеченность метилирования ряда генов миРНК в клинические проявления ПОЯ и гистологические варианты ЗОЯ.

## Заключение

В данной работе впервые выявлены ассоциации метилирования генов *MIR148A* и *MIR191* со специфичными гистологическими вариантами рака яичников. Для группы генов миРНК, включая *MIR148A*, установлено повышение метилирования у больных ПОЯ в сравнении как со здоровыми женщинами, так и с больными ЗОЯ. В целом полученные результаты подтверждают регуляторную роль эпигенетических факторов в процессах формирования различных клинических фенотипов рака яичников. ©

## Дополнительная информация

### Финансирование

Работа выполнена за счет финансирования Российским научным фондом, грант № 20-15-00368.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

### Участие авторов

С.С. Лукина – проведение экспериментальных исследований; А.М. Бурденный – дизайн экспериментальной части исследования, анализ результатов, написание, редактирование и утверждение итогового варианта текста; Е.А. Филиппова – статистическая обработка

данных, проведение экспериментальных исследований; И.В. Пронина – проведение экспериментальных исследований; Т.П. Казубская, Д.Н. Кушлинский и Д.О. Уткин – сбор и обработка материала; Э.А. Брага – концепция и дизайн исследования, написание, редактирование и утверждение итогового варианта текста; В.И. Логинов – анализ результатов, написание, редактирование и утверждение итогового варианта текста; Н.Е. Кушлинский – концепция статьи, анализ клинико-экспериментальных результатов исследования. 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.

## Литература / References

1. Shih IM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004;164(5):1511–1518. doi: 10.1016/s0002-9440(10)63708-x.
2. Hauptmann S, Friedrich K, Redline R, Avril S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2017;470(2): 125–142. doi: 10.1007/s00428-016-2040-8.
3. Acs G. Serous and mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary. *Pathol Patterns Rev.* 2005;123(Suppl 1):S13–S57. doi: 10.1309/J6PXXK1HQJAEVPM.
4. Sun Y, Xu J, Jia X. The Diagnosis, Treatment, Prognosis and Molecular Pathology of Borderline Ovarian Tumors: Current Status and Perspectives. *Cancer Manag Res.* 2020;12:3651–3659. doi: 10.2147/CMAR.S250394.
5. Lee H, Park CS, Deftereos G, Morihara J, Stern JE, Hawes SE, Swisher E, Kiviat NB,





- Feng Q. MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *World J Surg Oncol*. 2012;10:174. doi: 10.1186/1477-7819-10-174.
6. Ferreira P, Roela RA, Lopez RVM, Del Pilar Estevez-Diz M. The prognostic role of microRNA in epithelial ovarian cancer: a systematic review of literature with an overall survival meta-analysis. *Oncotarget*. 2020;11(12):1085–1095. doi: 10.18632/oncotarget.27246.
  7. Prahm KP, Høgdall CK, Karlsen MA, Christensen IJ, Novotny GW, Høgdall E. MicroRNA characteristics in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2021;16(6):e0252401. doi: 10.1371/journal.pone.0252401.
  8. Chen S, Chen X, Xiu YL, Sun KX, Zhao Y. Inhibition of Ovarian Epithelial Carcinoma Tumorigenesis and Progression by microRNA 106b Mediated through the RhoC Pathway. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125714. doi: 10.1371/journal.pone.0125714.
  9. Kim S, Choi MC, Jeong JY, Hwang S, Jung SG, Joo WD, Park H, Song SH, Lee C, Kim TH, An HJ. Serum exosomal miRNA-145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas. *J Cancer*. 2019;10(9):1958–1967. doi: 10.7150/jca.30231.
  10. Piletić K, Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2405–2419. doi: 10.1007/s00204-016-1815-7.
  11. Брага ЭА, Логинов ВИ, Филиппова ЕА, Бурденный АМ, Пронина ИВ, Казубская ТП, Ходырев ДС, Уткин ДО, Кушлинский ДН, Адамян ЛВ, Кушлинский НЕ. Диагностическое значение группы генов микроРНК, гиперметилированных в карциноме яичников. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018;166(8):213–217. [Braga EA, Loginov VI, Filippova EA, Burdennyi AM, Pronina IV, Kazubskaya TP, Khodyrev DS, Utkin DO, Kushlinskii DN, Adamyan LV, Kushlinskii NE. Diagnostic Value of a Group of MicroRNA Genes Hypermethylated in Ovarian Carcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2018;166(2):253–256. doi: 10.1007/s10517-018-4326-0.]
  12. Loginov VI, Pronina IV, Burdennyi AM, Filippova EA, Kazubskaya TP, Kushlinsky DN, Utkin DO, Khodyrev DS, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene*. 2018;662:28–36. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.005.
  13. Филиппова ЕА, Логинов ВИ, Бурденный АМ, Пронина ИВ, Казубская ТП, Кушлинский ДН, Уткин ДО, Фридман МВ, Ходырев ДС, Кушлинский НЕ, Брага ЭА. Гиперметилированные гены микроРНК в карциноме яичников: системы маркеров прогноза метастазирования. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(1):86–90. [Filippova EA, Loginov VI, Burdennyi AM, Braga EA, Pronina IV, Kazubskaya TP, Kushlinskii DN, Utkin DO, Fridman MV, Khodyrev DS, Kushlinskii NE. Hypermethylated Genes of MicroRNA in Ovarian Carcinoma: Metastasis Prediction Marker Systems. *Bull Exp Biol Med*. 2019;167(1):79–83. doi: 10.1007/s10517-019-04465-5.]
  14. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. John Wiley & Sons; 2017. 241 p.
  15. Филиппова ЕА, Бурденный АМ, Лукина СС, Иванова НА, Пронина ИВ, Казубская ТП, Брага ЭА, Логинов ВИ. Изменение уровня метилирования группы генов микроРНК как фактора развития и прогрессии рака молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021;65(3):4–11. doi: 10.25557/0031-2991.2021.03.4-11. [Filippova EA, Burdennyi AM, Lukina SS, Ivanova NA, Pronina IV, Kazubskaya TP, Braga EA, Loginov VI. [Changes in the methylation level of microRNA genes as a factor of breast cancer development and progression]. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2021;65(3):4–11. Russian. doi: 10.25557/0031-2991.2021.03.4-11.]
  16. Hattermann K, Mehdorn HM, Mentlein R, Schultka S, Held-Feindt J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal Biochem*. 2008;377(1):62–71. doi: 10.1016/j.ab.2008.03.014.
  17. Loginov VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Pronina IV, Khodyrev DS, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Gerashchenko GV, Chashchina LI, Kazubskaya TP, Kondratieva TT, Lerman MI, Angeloni D, Braga EA, Kashuba VI. Tumor Suppressor Function of the SEMA3B Gene in Human Lung and Renal Cancers. *PLoS One*. 2015;10(5):e0123369. doi: 10.1371/journal.pone.0123369.
  18. Panagopoulou M, Karaglani M, Balgkouranidou I, Bizioti E, Koukaki T, Karamitrous E, Nena E, Tsamardinos I, Kolios G, Lianidou E, Kakolyris S, Chatzaki E. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers. *Oncogene*. 2019;38(18):3387–3401. doi: 10.1038/s41388-018-0660-y.
  19. Логинов ВИ, Бурденный АМ, Пронина ИВ, Хоконова ВВ, Куревлев СВ, Казубская ТП, Кушлинский НЕ, Брага ЭА. Новые гены микроРНК, гиперметилированные при раке молочной железы. *Молекулярная биология*. 2016;50(5):797–802. doi: 10.7868/S0026898416050104. [Loginov VI, Burdennyi AM, Pronina IV, Khokonova VV, Kurevlev SV, Kazubskaya TP, Kushlinskii NE, Braga EA. Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer. *Molecular Biology*. 2016;50(5):705–709.]
  20. Tam KF, Liu VWS, Liu SS, Tsang PCK, Cheung ANY, Yip AMW, Ngan HYS. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007;133(5):331–341. doi: 10.1007/s00432-006-0178-5.
  21. Singh A, Gupta S, Sachan M. Epigenetic Biomarkers in the Management of Ovarian Cancer: Current Prospectives. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:182. doi: 10.3389/fcell.2019.00182.
  22. Koukoura O, Spandidos DA, Daponte A, Sifakis S. DNA methylation profiles in ovarian cancer: implication in diagnosis and therapy (Review). *Mol Med Rep*. 2014;10(1):3–9. doi: 10.3892/mmr.2014.2221.
  23. Loginov VI, Pronina IV, Filippova EA, Burdennyi AM, Lukina SS, Kazubskaya TP, Uroshlev LA, Fridman MV, Brovkinia OI, Apanovich NV, Karpukhin AV, Stilidi IS, Kushlinskii NE, Dmitriev AA, Braga EA. Aberrant Methylation of 20 miRNA Genes Specifically Involved in Various Steps of Ovarian Carcinoma Spread: From Primary Tumors to Peritoneal Macroscopic Metastases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1300. doi: 10.3390/ijms23031300.
  24. Davidson B, Tropé CG, Reich R. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Front Oncol*. 2012;2:33. doi: 10.3389/fonc.2012.00033.
  25. Klymenko Y, Kim O, Stack MS. Complex Determinants of Epithelial: Mesenchymal Phenotypic Plasticity in Ovarian Cancer. *Cancers*. 2017;9(8):104. doi: 10.3390/cancers908104.
  26. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1438–1449. doi: 10.1038/nm.3336.
  27. Skrypek N, Goossens S, De Smedt E, Vandamme N, Bex G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet*. 2017;33(12):943–959. doi: 10.1016/j.tig.2017.08.004.
  28. Nguyen VHL, Yue C, Du KY, Salem M, O'Brien J, Peng C. The Role of microRNAs in Epithelial Ovarian Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):7093. doi: 10.3390/ijms21197093.
  29. Бурденный АМ, Филиппова ЕА, Иванова НА, Лукина СС, Пронина ИВ, Логинов ВИ, Фридман МВ, Казубская ТП, Уткин ДО, Брага ЭА, Кушлинский НЕ. Гиперметилирование генов новых длинных некодирующих РНК в опухолях яичников и метастазах: двойственный эффект. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;171(3):353–358. doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-3-353-358. [Burdennyi AM, Filippova EA, Ivanova NA, Lukina SS, Pronina IV, Loginov VI, Fridman MV, Kazubskaya TP, Utkin DO, Braga EA, Kushlinskii NE. Hypermethylation of Genes in New Long Noncoding RNA in Ovarian Tumors and Metastases: A Dual Effect. *Bull Exp Biol Med*. 2021;171(3):370–374. doi: 10.1007/s10517-021-05230-3.]



# Clinical features of the microRNA genes methylation in borderline ovarian tumors and depending on the histological structure in ovarian malignancies

S.S. Lukina<sup>1</sup> • A.M. Burdennyi<sup>1</sup> • E.A. Filippova<sup>1</sup> • I.V. Pronina<sup>1</sup> • T.P. Kazubskaya<sup>2</sup> • D.N. Kushlinsky<sup>2</sup> • D.O. Utkin<sup>3</sup> • E.A. Braga<sup>1</sup> • V.I. Loginov<sup>1</sup> • N.E. Kushlinskii<sup>2</sup>

**Background:** Borderline ovarian tumors (BOT) belong to the intermediate type between benign and malignant ovarian neoplasms. Serous borderline tumors share common molecular and genetic characteristics with serous carcinomas. An increase in the methylation level of microRNA (miRNA) genes group has been previously shown during the development and progression of ovarian cancer. However, the study results are contradictory, and their number is not sufficient for a consensus. Current study is the first to search for aberrant methylated genes of the BOT-specific microRNA and for some histological subtypes of ovarian cancer.

**Materials and methods:** The study was based on a set of 99 paired (tumor/healthy) ovarian tumor samples. Methylation analysis was carried out with quantitative methyl-specific polymerase chain reaction (PCR). Screening for BOT biomarkers was performed in 21 genes of miRNA.

**Results:** We have found that some miRNA genes (*MIR124-1*, *MIR125B-1*, *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR193A*, *MIR203A*, *MIR107*, *MIR1258*, *MIR339*) were characterized by a high methylation level in the patients with BOT, compared to that in the tissues of healthy women. At the same time, the methylation level in the patients with malignant ovarian tumors (MOT) either differed slightly or was even lower. For the *MIR129-2*, *MIR132*, *MIR148A*, *MIR203*, *MIR107* and *MIR1258* genes, a higher level of methylation was detected in the BOT patients,

compared to the MOT patients. The methylation level of the *MIR148A* gene in the BOT patients was 4-fold higher than that in the MOT (31.3% vs 7.9%,  $p=0.047$ , multiple two-sided Kruskal-Wallis test). The methylation levels of the miRNA genes *MIR148A* and *MIR191* were significantly reduced in serous cystadenocarcinoma and increased in serous and endometrioid adenocarcinomas.

**Conclusion:** Methylation of the miRNA *MIR148A* and *MIR191* genes is significantly associated with various histological variants of ovarian cancer. We have shown an increased methylation level of a number of miRNA genes in BOT, compared to MOT. In general, epigenetic factors play a role in the clinical differences between histological forms of ovarian cancer and borderline tumors.

**Key words:** borderline ovarian tumors, malignant ovarian tumors, histological type of ovarian cancer, microRNA gene methylation, *MIR148A* gene

**For citation:** Lukina SS, Burdennyi AM, Filippova EA, Pronina IV, Kazubskaya TP, Kushlinsky DN, Utkin DO, Braga EA, Loginov VI, Kushlinskii NE. Clinical particulars of the microRNA genes methylation in borderline ovarian tumors and depending on the histological structure in ovarian malignancies. Almanac of Clinical Medicine. 2022;50. doi: 10.18786/2072-0505-2022-50-001.

Received 29 October 2021; revised 10 November 2021; accepted 12 November 2021; published online 17 February 2022

**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](mailto:sveta_sergeevna349@mail.ru)

**Alexey M. Burdennyi** – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>. E-mail: [burdennyi@gmail.com](mailto:burdennyi@gmail.com)

**Elena A. Filippova** – MD, 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](mailto:p.lenyxa@yandex.ru)

**Irina V. Pronina** – PhD (in Biol.), 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](mailto:zolly_sten@mail.ru)

**Tatiana P. Kazubskaya** – MD, PhD, Oncogeneticist, Senior Research Fellow, Laboratory of Clinical Oncogenetics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>. E-mail: [oncogen5@ronc.ru](mailto:oncogen5@ronc.ru)

**Dmitry N. Kushlinsky** – Oncologist, Laboratory of Clinical Biochemistry and Laboratorial Diagnostics<sup>2</sup>. E-mail: [biochimia@yandex.ru](mailto:biochimia@yandex.ru)

**Dmitriy O. Utkin** – Surgeon, Department of Gynaecological Oncology<sup>3</sup>. E-mail: [burdennyi@gmail.com](mailto:burdennyi@gmail.com)

**Eleonora A. Braga** – Doctor of Biol. Sci., Professor, Chief Research Fellow, Head of Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>. ✉ 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 545 43 93. E-mail: [eleonora10\\_45@mail.ru](mailto:eleonora10_45@mail.ru)

**Vitaly I. Loginov** – PhD (in Biol.), Leading Research Fellow, Laboratory of Pathogenomics and Transcriptomics<sup>1</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>. E-mail: [loginov7w@gmail.com](mailto:loginov7w@gmail.com)

**Nikolay E. Kushlinskii** – MD, PhD, Professor, Member of Russ. Acad. Sci., Head of Laboratory of Clinical Biochemistry and Laboratorial Diagnostics<sup>2</sup>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>. E-mail: [biochimia@yandex.ru](mailto:biochimia@yandex.ru)

## Funding

The study was financed from the Russian Science Foundation, grant # 20-15-00368.

## Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests as per this article.

## Authors' contributions

S.S. Lukina, the experimental part of the study; A.M. Burdennyi, design of experimental part of the study, analysis of the results, text writing, text editing, approval of the final version of the manuscript; E.A. Filippova, statistical analysis, experimental part of the study; I.V. Pronina, the experimental part of the study; T.P. Kazubskaya, D.N. Kushlinsky and D.O. Utkin, data collection and management; E.A. Braga, the study concept and design, text writing, text editing, approval of the final version of the manuscript; V.I. Loginov, analysis of the results, text writing, text editing, approval of the final version of the manuscript; N.E. Kushlinskii, concept of the paper, analysis of the clinical and experimental results. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

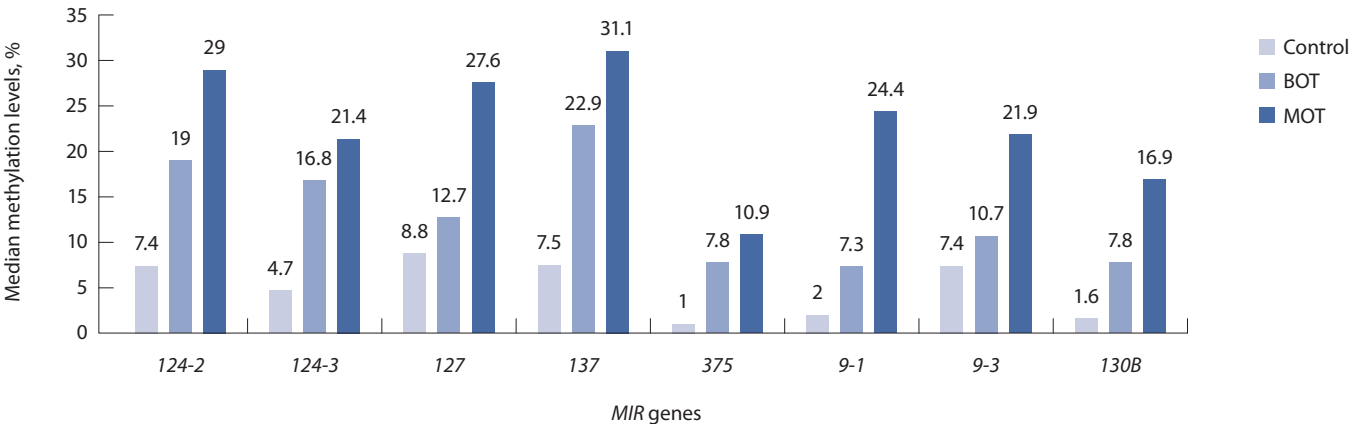
<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya ul., Moscow, 125315, Russian Federation

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 23 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

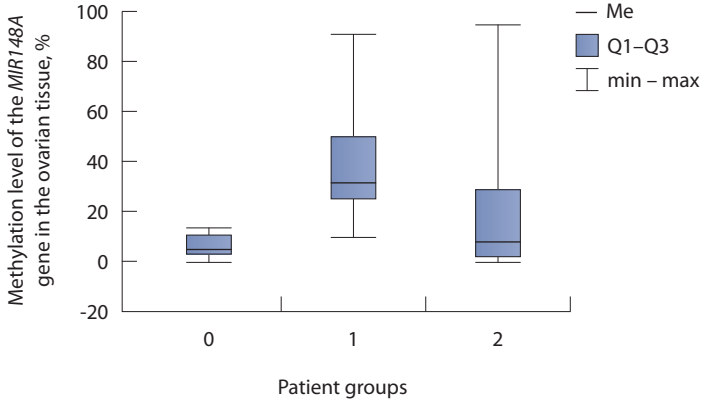
<sup>3</sup>Moscow Municipal Oncological Hospital No. 62; 27 Istra poselok, Krasnogorskiy rayon, 143423, Russian Federation

**Table 1.** Distribution of the patients with malignant ovarian tumors depending on the histological type of the tumor

Histological type	Frequency, N (%)
Serous adenocarcinoma	44 (47.3)
Serous cystadenocarcinoma	38 (40.9)
Mucinous cystadenocarcinoma	1 (1.0)
Endometrioid adenocarcinoma	10 (10.8)



**Fig. 1.** Median methylation levels for 8 miRNA genes in the patients with malignant ovarian tumors (MOT), compared to the patients with borderline ovarian tumors (BOT) and the control group



**Fig. 2.** Methylation levels of the MIR148A gene in the ovarian tissue from the control group (0), the borderline ovarian tumor group (1), and the malignant ovarian tumor group (2)

**Table 2.** Analysis of the miRNA gene methylation in the tissue samples from various patient groups and the control group

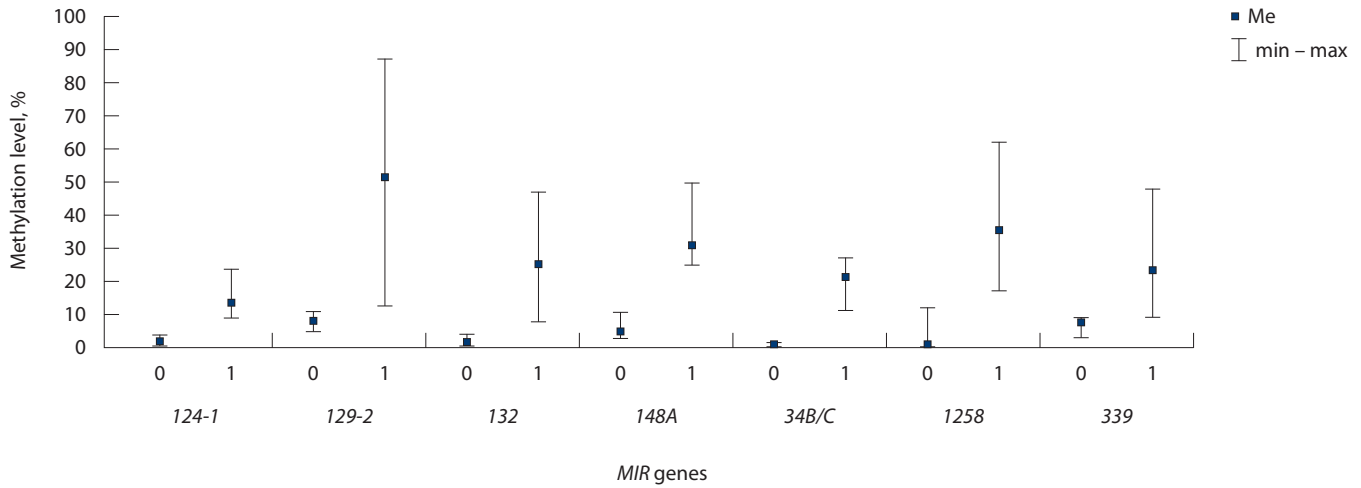
MIR gene	Methylation in the ovarian tissue, Me [Q1; Q3], Min–Max, %			P value* (FDR=0.01)
	Control (n=15)	Ovarian tumor tissue		
		BOT (n=6)	MOT (n=93)	
124-1	0.5 [0.2; 3.1], 0.1–9.2	14.0 [8.9; 24.0], 8.8–45.0	10.0 [2.6; 21.6], 0–67.3	$p_{0-2} < 0.0001$ $p_{0-1} = 0.003$
124-2	7.4 [0.2; 13.1], 0.1–19.5	19.0 [11.0; 36.5], 6.4–92.3	29.0 [6.8; 51.7], 0–98.1	$p_{0-2} = 0.0017$
124-3	4.7 [0.3; 8.9], 0.1–17.8	16.8 [12.7; 30.9], 9.6–34.6	21.4 [8.5; 41.7], 0.04–95.3	$p_{0-2} < 0.0001$
125B-1	5.6 [1.6; 11.4], 1.1–16.2	36.6 [1.5; 75.1], 0.4–97.3	34.8 [11.2; 60.6], 0.1–99.3	$p_{0-2} < 0.0001$
127	8.8 [0.9; 11.1], 0.2–18.8	12.7 [1.6; 20.4], 1.0–31.0	27.6 [4.8; 53.9], 0.08–93.3	$p_{0-2} < 0.001$
129-2**	8.2 [4.9; 11.2], 4.3–13.3	51.6 [12.7; 87.4], 2.1–89.0	31.2 [10.3; 51.5], 0.3–99.3	$p_{0-2} < 0.001$ $p_{0-1} = 0.036$
132**	1.3 [0.1; 4.3], 0.1–9.0	25.6 [7.6; 47.2], 0.2–62.5	9.8 [3.6; 31.9], 0.05–98.8	$p_{0-2} < 0.0001$ $p_{0-1} = 0.008$
137	7.5 [2.9; 10.0], 0.3–13.2	22.9 [1.8–76.7], 1.0–90.0	31.1 [2.5; 56.9], 0–98.5	$p_{0-2} = 0.018$
148A**	5.0 [3.0; 10.9], 0.1–13.6	31.3 [25.0; 50.0], 9.9–90.8	7.9 [1.9; 28.7], 0–94.4	$p_{0-1} = 0.018$ $p_{1-2} = 0.047$
191	28.5 [13.8; 32.9], 8.6–94.4	4.8 [1.8; 22.2], 1.7–33.8	7.0 [2.4; 25.8], 0.01–90.7	$p_{0-2} = 0.006$
193A	4.5 [0.3; 7.3], 0.1–12.2	32.1 [8.5; 38.3], 0.1–53.1	34.8 [15.4; 56.4], 0.1–98.4	$p_{0-2} < 0.0001$
203**	6.9 [0.9; 9.9], 0.1–15.2	13.8 [0.6; 74.5], 0.2–90.9	6.8 [1.3; 35.3], 0.01–98.2	–
212	4.6 [1.6; 8.3], 0.2–13.9	5.9 [0.4; 17.8], 0.03–70.5	4.8 [1.5; 12.6], 0.02–98.2	–
34B/C	0.9 [0.4; 1.7], 0.1–7.7	21.3 [11.4; 27.4], 3.7–76.2	17.6 [3.1; 35.4], 0.01–98.1	$p_{0-2} < 0.0001$ $p_{0-1} = 0.005$
375	1.0 [0.2; 2.8], 0.1–9.1	7.8 [2.2; 15.0], 0.01–28.2	10.9 [3.2; 34.2], 0–92.5	$p_{0-2} < 0.001$
9-1	2.0 [1.4; 4.0], 0.1–8.8	7.3 [4.0; 10.0], 0.05–94.6	24.4 [7.7; 56.3], 0.01–93.6	$p_{0-2} < 0.0001$
9-3	7.4 [5.2; 14.9], 0–18.0	10.7 [5.4; 24.8], 2.1–36.5	21.9 [7.2; 36.4], 0.02–98.3	$p_{0-2} = 0.014$
130B	1.6 [0.3; 2.9], 0–7.2	7.8 [1.6; 28.2], 1.4–91.4	16.9 [6.8; 32.5], 0.1–99.1	$p_{0-2} < 0.0001$
107**	7.2 [2.4; 10.2], 1.6–17.4	26.1 [18.2; 31.1], 3.5–92.3	15.7 [6.2; 53.5], 0–93.0	$p_{0-2} = 0.024$
1258**	1.0 [0.3; 12.2], 0.2–14.1	35.6 [17.0; 62.2], 4.2–70.2	11.2 [4.4; 40.8], 0.1–90.8	$p_{0-2} < 0.001$ $p_{0-1} = 0.002$
339	7.9 [3.2; 9.4], 1.2–11.8	23.6 [9.2; 48.1], 8.2–99.9	21.2 [8.2; 54.3], 0.2–99.7	$p_{0-2} < 0.001$ $p_{0-1} = 0.009$

BOT, borderline ovarian tumors; FDR, false discovery rate, an expected proportion of false positive abnormalities; MOT, malignant ovarian tumors

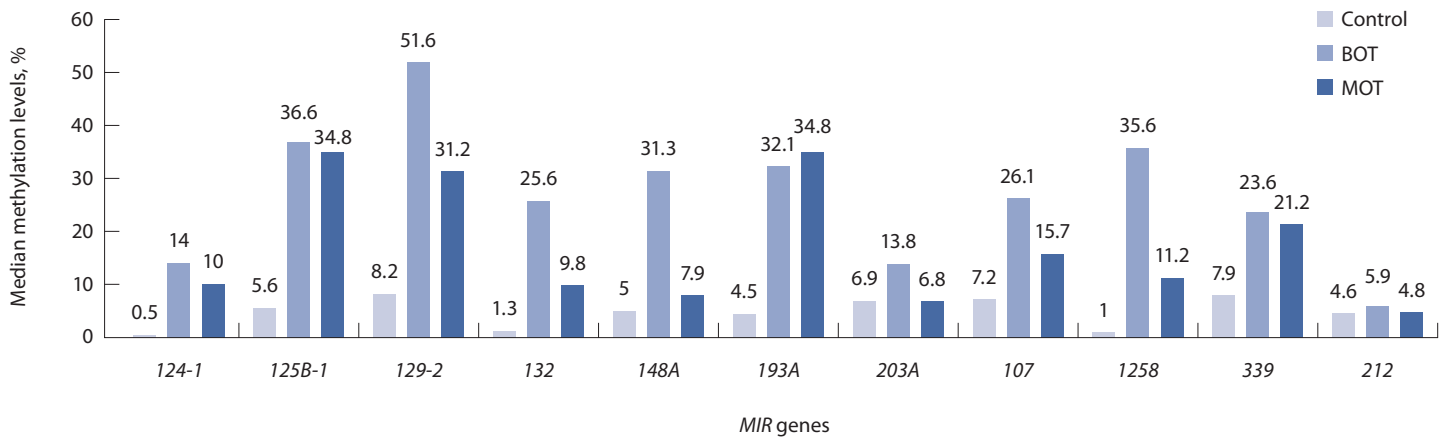
$p_{0-1}$ , the difference between the control group and the BOT group;  $p_{0-2}$ , the difference between the control group and the MOT group;  $p_{1-2}$ , the difference between the BOT and the MOT groups

\* Only significant difference is given

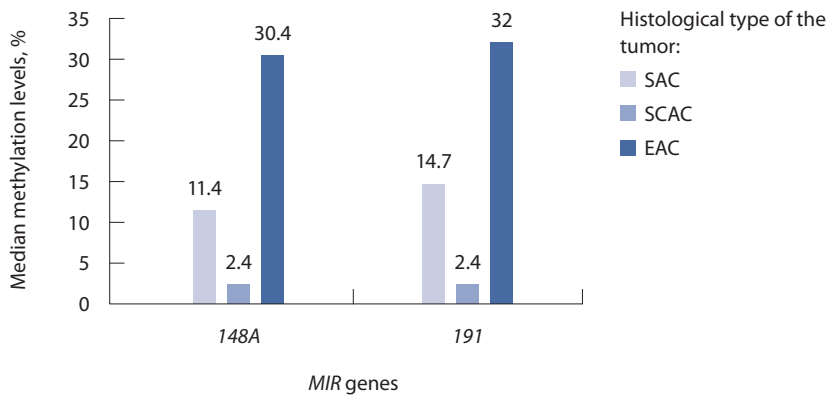
\*\* The genes with median values substantially higher in BOT, than in MOT



**Fig. 3.** Median values and quartiles for the methylation levels of a number of genes in the control group (0) and the borderline ovarian tumor group (1)



**Fig. 4.** Increased methylation of 10 miRNA genes in the patients with borderline ovarian tumors (BOT), compared both to the control group and to the patients with malignant ovarian tumors (MOT) (excluding *MIR193A*)



**Fig. 5.** Median values of the miRNA gene methylation in the ovarian cancer tissue samples that were significantly associated with histological type of the tumor. EAC, endometrioid adenocarcinoma; SAC, serous adenocarcinoma; SCAC, serous cystadenocarcinoma



**Table 3.** Methylation of the miRNA gene group in the malignant ovarian tumor tissue depending on the histological type of the tumor

MIR gene	Methylation in the ovarian tumor tissue, Me [Q1; Q3], %			
	Histological type of the tumor			
	SAC (n=44)	SCAC (n=38)	EAC (n=10)	MCAC (n=1)
124-1	11.4 [3.3; 21.0]	10.0 [2.6; 30.0]	3.8 [0.4; 21.2]	2.1
124-2	42.0 [7.2; 66.7]	21.2 [6.8; 37.2]	11.7 [3.0; 41.2]	0
124-3	21.3 [11.9; 35.8]	18.8 [4.8; 50.3]	28.8 [8.6; 39.8]	52.7
125B-1	32.8 [11.2; 57.6]	35.5 [13.0; 69.1]	33.4 [11.2; 85.0]	7.1
127	35.9 [5.1; 56.1]	18.8 [3.9; 45.0]	34.5 [18.2; 45.1]	54.3
129-2	32.1 [7.6; 46.6]	39.4 [12.5; 84.3]	23.0 [15.2; 31.2]	2.9
132	9.4 [4.5; 16.9]	11.5 [3.6; 57.3]	11.7 [1.9; 35.3]	0.1
137	36.6 [8.0; 53.1]	33.3 [2.0; 60.1]	12.7 [1.0; 64.4]	2.3
148A*	11.4 [5.9; 34.9]	2.4 [1.1; 10.1]	30.4 [7.2; 45.8]	1.9
191*	14.7 [4.9; 28.8]	2.4 [0.7; 7.0]	32.0 [11.2; 42.0]	21.3
193A	27.6 [14.5; 54.3]	42.3 [9.0; 59.7]	38.7 [24.9; 66.4]	34.6
203A	6.1 [0.9; 33.7]	10.3 [2.6; 40.9]	3.0 [1.0; 37.6]	1.3
212	8.7 [1.6; 13.6]	2.9 [1.1; 7.4]	9.5 [0.5; 31.1]	2.6
34B/C	12.7 [3.8; 29.8]	23.1 [2.3; 49.2]	11.2 [1.3; 15.7]	31.3
375	9.8 [0.5; 36.7]	11.3 [4.3; 37.6]	10.8 [8.1; 18.0]	1.6
9-1	25.6 [10.6; 53.8]	38.2 [3.0; 63.6]	20.0 [2.2; 24.2]	2.0
9-3**	15.8 [5.9; 23.9]	31.3 [13.5; 52.2]	16.0 [4.6; 45.1]	3.1
130B	16.1 [7.3; 23.9]	22.2 [6.8; 48.2]	15.1 [4.5; 39.0]	1.9
107	10.5 [5.8; 56.9]	22.2 [6.2; 44.5]	26.3 [8.3; 59.2]	2.7
1258**	8.2 [3.9; 27.2]	25.1 [7.1; 56.2]	5.0 [3.5; 8.0]	27.2
339	18.7 [2.7; 49.3]	21.1 [11.2; 59.1]	22.0 [12.0; 26.5]	44.6

EAC, endometrioid adenocarcinoma; MCAC, mucinous cystadenocarcinoma; SAC, serous adenocarcinoma; SCAC, serous cystadenocarcinoma

\*p < 0.001, FDR (false discovery rate, an expected proportion of false positive abnormalities) = 0.01

\*\*p < 0.05, FDR (false discovery rate, an expected proportion of false positive abnormalities) = 0.01