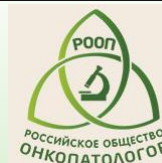


ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И
ПЕРИНАТОЛОГИИ
имени академика В.И. Кулакова
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Конференция «Онкогинекология - 2017»



Поиск маркеров ранней диагностики серозных карцином яичника по профилю экспрессии мкРНК методом глубокого секвенирования

Докладчик – с.н.с. лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции **Тимофеева А.В.**

Соисполнители работы – сотрудники отделения патологической анатомии, отделения инновационной гинекологии и онкологии, отдела системной биологии в репродукции – **Асатурова А.В., Санникова М.В., Хабас Г.Н., Чаговец В.В.**

Молекулярная онкология

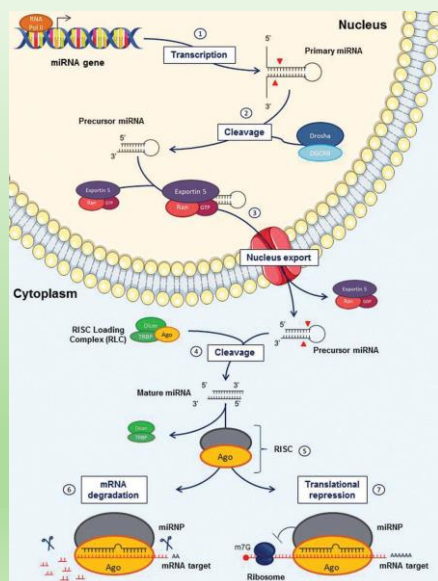
Начало 21 века ознаменовалось стремительным накоплением данных в области молекулярной онкологии благодаря использованию высокотехнологичных методов исследования, таких как **экспрессионные микрочиповые технологии (microarray), метод глубокого секвенирования РНК, масс-спектрометрия.**

За последние годы стало очевидным, что **эпигенетические регуляторные механизмы играют ключевую роль** в прогрессии опухолей и особая роль принадлежит некодирующим РНК.

Не менее 75% генома человека способно транскрибироваться и более половины этих транскриптов относятся к некодирующим РНК (длинные РНК размером от 200 н. до 10 т.н. и малые РНК размером от 17 до 200 н.). Наиболее изученными с точки зрения онкогенеза являются малые некодирующие РНК, в частности, **мкРНК.**

Поскольку **мкРНК** регулируют экспрессию ключевых генов, задействованных в возникновении и прогрессии опухолей, их **можно не только считать перспективными маркерами ранней диагностики и прогноза заболевания, но и мишенями для терапевтического воздействия.**

Биогенез и функция мкРНК



мкРНК – негативные регуляторы экспрессии кодирующих белок генов путем комплементарного взаимодействия с мРНК, обуславливая ингибирование трансляции или снижение стабильности мРНК. Гены мкРНК распределены по всему геному человека. Могут образовывать кластеры для координированной экспрессии мкРНК.

При онкогенезе изменение уровня экспрессии мкРНК происходит, в основном, за счет: 1) **изменения статуса метилирования промотора гена** (при опухолях яичников эпигенетическая супрессия наблюдается у 36% мкРНК), 2) **изменения копийности генов** (при карциноме яичников потеря копийности генов обуславливает снижение экспрессии 15% мкРНК, в том числе обладающих онкосупрессорной активностью).

Рак яичника. Актуальность молекулярных исследований.

- Отличается наибольшей летальностью среди злокачественных заболеваний женской репродуктивной системы.
- Отсутствие ранних специфических симптомов и эффективного скрининга пациентов по специфическим диагностическим маркерам разных типов рака яичника обуславливают увеличение числа пациентов с диагностированным заболеванием на поздних стадиях развития.
- Быстрое развитие множественной лекарственной устойчивости опухоли является существенной помехой на пути успешной терапии рака яичника. Для ее преодоления необходимо понять молекулярный механизм возникновения лекарственной устойчивости.
- Многокомпонентный и многоуровневый патогенез карцином яичника требует применение высокотехнологичных методов исследования на геном, транскрипционном и белковом уровнях **в одном и том же образце (!)** опухолевой ткани для последующего системного анализа данных и создания молекулярного портрета опухоли.

Эпителиальный рак яичников

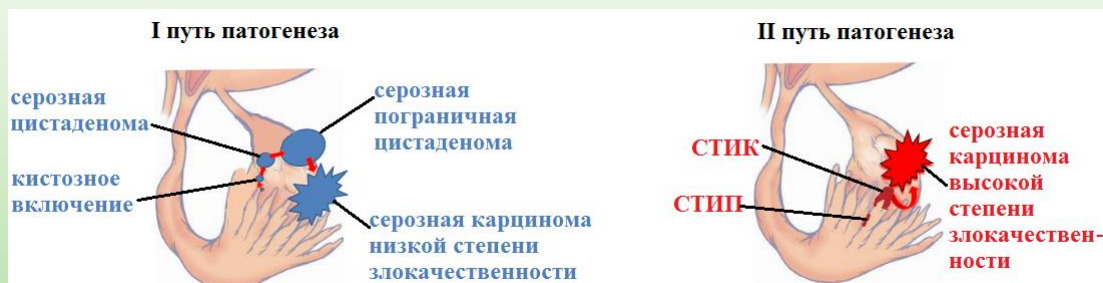
Составляет 90% от всех злокачественных новообразований яичника. Является гетерогенной группой карцином и состоит из нескольких гистологических подгрупп:

- серозная карцинома (высокой и низкой степени злокачественности)
- муцинозная карцинома
- эндометриоидная карцинома
- светлоклеточная карцинома
- злокачественная опухоль Бреннера

Среди эпителиальных злокачественных новообразований самой распространенной является серозная карцинома высокой степени злокачественности. Характеризуется высокой гетерогенностью опухоли, геномной нестабильностью, изменением статуса метилирования промоторов генов:

- в 96% случаях мутации в гене TP53 в сочетании или без соматических мутаций в генах NF1, BRCA1, BRCA2, RB1, and CDK12
- 113 значимых aberrаций числа копий ДНК
- изменение профилей метилирования 168 генов и ассоциированной с этими изменениями дифференциальной экспрессией 253 генов, из которых 89% потенциально регулируются целой сетью мкРНК (данные системного анализа в рамках проекта «The Cancer Genome Atlas, TCGA»)

Патогенез серозной карциномы яичника



1 путь патогенеза заключается в диссеминации эпителиальных стволовых клеток маточной трубы на поверхность яичника (предположительно в сайт овуляции) с формированием кистозных включений, которые могут увеличиваться в объеме с образованием серозной кистаденомы с последующей трансформацией в серозную пограничную кистадену и **серозную карциному низкой степени злокачественности**.

Патогенез серозной карциномы яичника высокой степени злокачественности начинается с пролиферации секреторных клеток или стволовых клеток маточной трубы с возникновением в них мутаций в гене p53 (p53-signature) и формированием серозного трубного интраэпителиального поражения (СТИП). При приобретении дополнительных соматических мутаций формируется серозная трубная интраэпителиальная карцинома (СТИК), клетки которой диссеминируют на поверхность яичника и формируют опухоль.

Цель настоящей работы

Создать молекулярный портрет серозной карциномы яичников высокой степени злокачественности, серозной пограничной цистаденомы, серозной доброкачественной цистаденомы и фимбриального отдела маточных труб по профилю экспрессии мкРНК методом глубокого секвенирования для понимания молекулярных механизмов патогенеза карциномы яичников и создания скринингового теста ранней неинвазивной диагностики заболевания.

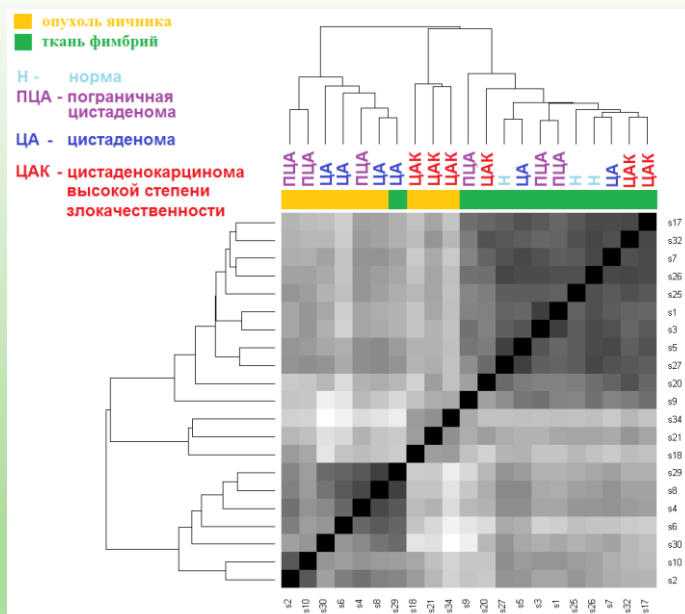
Общая схема исследования



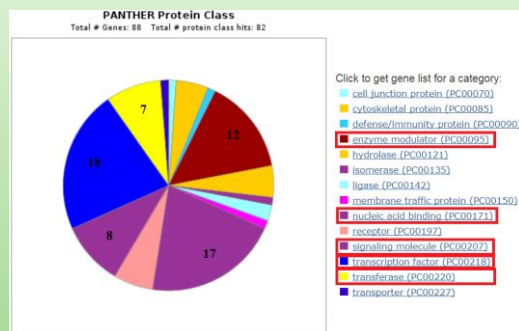
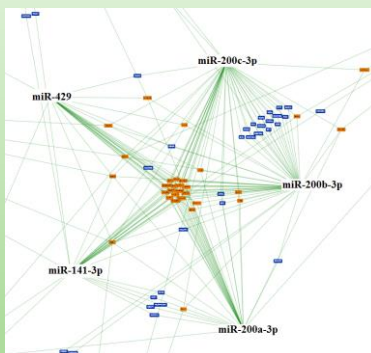
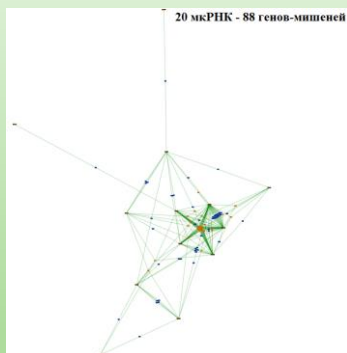
Группы пациентов, взятых в исследование

| кодировка пациента | кодировка образца | локализация образца | гистологическое заключение |
|--------------------|-------------------|-----------------------|---|
| P1 | s26 | маточная труба левая | норма |
| P1 | s27 | маточная труба правая | норма |
| P2 | s25 | маточная труба | норма |
| P3 | s29 | маточная труба | норма |
| P3 | s30 | яичник | цистаденофиброма |
| P4 | s5 | маточная труба левая | норма |
| P4 | s7 | маточная труба правая | норма |
| P4 | s6 | яичник левый | цистаденома |
| P4 | s8 | яичник правый | цистаденома |
| P5 | s1 | маточная труба | папиллярная гиперплазия |
| P5 | s2 | яичник | пограничная цистаденофиброма |
| P6 | s9 | маточная труба | папиллярная гиперплазия |
| P6 | s10 | яичник | пограничная папиллярная цистаденома |
| P7 | s3 | маточная труба | участок с пролиферацией выстилающего эпителия |
| P7 | s4 | яичник | пограничная папиллярная цистаденофиброма |
| P8 | s17 | маточная труба | инвазивная серозная карцинома |
| P8 | s18 | яичник | серозная цистаденокарцинома высокой степени злокачественности |
| P9 | s20 | маточная труба | серозная трубная интраэпителиальная карцинома высокой степени злокачественности |
| P9 | s21 | яичник | серозная карцинома высокой степени злокачественности с прорастанием капсулы опухоли |
| P10 | s32 | маточная труба | аденокарцинома |
| P10 | s34 | яичник | серозная папиллярная цистаденокарцинома высокой степени злокачественности |

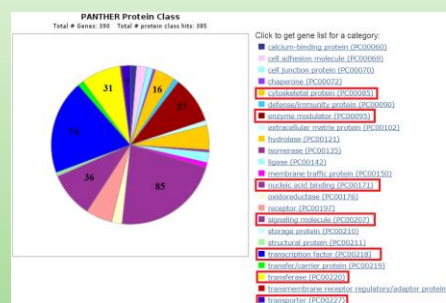
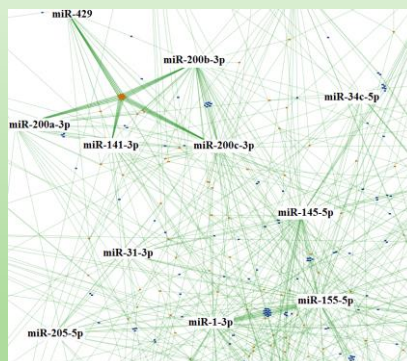
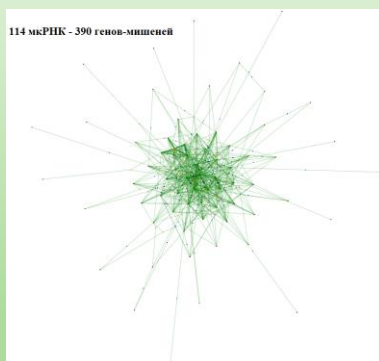
Корреляционная матрица данных глубокого секвенирования мкРНК



Гены-мишени мкРНК, дифференциально экспрессированных в пограничной серозной цистаденоме



Гены-мишени мкРНК, дифференциально экспрессированных в серозной цистаденокарциноме высокой степени злокачественности



Функциональное значение генов-мишеней мкРНК, ассоциированных с серозной карциномой яичника

! Выявленная по базам данным связь «мкРНК - ген-мишень», доказанная как минимум тремя независимыми исследованиями в разных биологических образцах и системах, **подлежит проверке в анализируемых нами образцах серозных опухолей яичников методом белковой масс-спектрометрии**, так как экспрессия белков генов-мишеней может оказаться тканеспецифичной. Данная работа находится на начальных этапах выполнения в отделе системной биологии в репродукции ФГБУ НМИЦАГиП им. В.И.Кулакова.

В первую очередь, интересуют белки, отвечающих за множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) клетки. Одним из важнейших механизмов МЛУ является изменение активности транспортных белков семейства ABC (49 разновидностей). При раке яичника ключевыми в развитии МЛУ являются три ABC-транспортера: Р-гликопротеин (MDR1), ABCG2 и MRP (Oxnard, 2016; Upadhyay et al., 2017). В настоящем исследовании в серозной карциноме высокой степени злокачественности обнаружено:

- достоверное снижение в 8 раз уровня экспрессии hsa-miR-129-5p, регулирующей MDR1. Резкое повышение MDR1 является предиктором плохого прогноза в случае миеломы, нейробластомы и колоректального рака (Battistella and Klok, 2017).
- достоверное снижение в 4-5 раз уровня экспрессии hsa-miR-328-3p и hsa-miR-195-3p, регулирующих ABCG2.
- достоверное снижение в 4-8 раз уровня экспрессии hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-1291, регулирующих MRP (ABCC1).

Терапевтическое использование мкРНК

В экспериментах с ксенографтами рака яичника у мышей доказано терапевтическое действие мкРНК на опухоль в составе нанолипосом (обзорная статья V. Mandilaras et al., 2017)

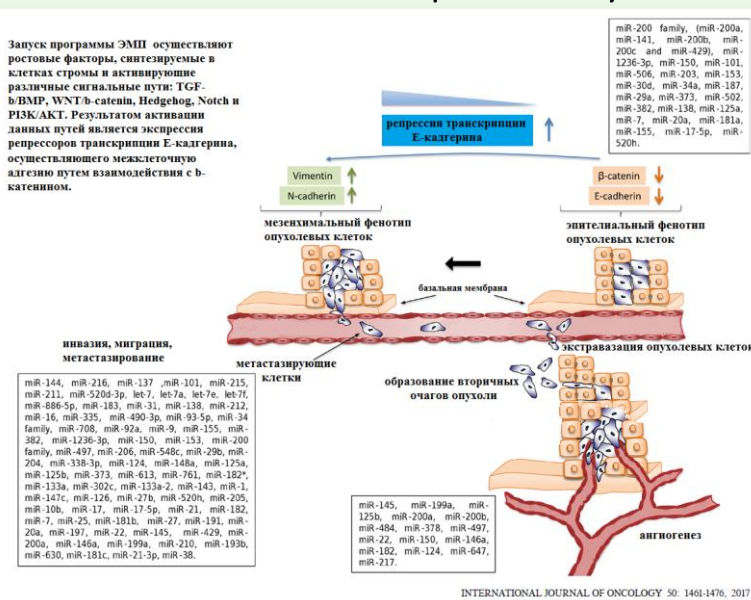
| miRNAs as therapeutics agents | | | | |
|-------------------------------|-------------------|---|----------------------------|------------------|
| miRNA | miRNA | In vivo effects | Directs targets | |
| miRNA | miR-26b | Reduce tumor growth/metastasis and EMT inhibition | KPNA2, Oct4 | |
| | miR-29b | Reduce tumor growth/inhibition of Warburg effect | AKT2/AKT3 | |
| | miR-30a-5p | Reduce tumor growth | ETaR | |
| | miR-93-5p | Reduce tumor growth | Rho C | |
| | miR-106b-5p | Reduce tumor growth | Rho C | |
| | miR-125b | Reduce tumor growth/metastasis and EMT inhibition | SET | |
| | miR-133a | Reduce tumor growth | IGF1R | |
| | miR-137 | Reduce tumor growth | Not investigated | |
| | miR-145 | Reduce tumor growth/metastasis | MTDH | |
| | miR-145 | Reduce tumor growth | TRIM2 | |
| | miR-192 | Reduce tumor growth/angiogenesis | EGR1, HOXB9 | |
| | miR-193b | Reduce tumor growth/metastasis | uPA | |
| | miR-200c | Reduce tumor growth/metastasis of stem cells and EMT inhibition | Not investigated | |
| | miR-302b | Reduce tumor growth | RUNX1 | |
| | miR-373 | Reduce metastasis | Rab22a | |
| | miR-490-3p | Reduce tumor growth | CDK1 | |
| | miR-718 | Reduce tumor growth | VEGF | |
| | miR-6126 | Reduce tumor growth | Integrin-β1 | |
| | miRNA + treatment | miR-15 + miR-16 | Sensitization to cisplatin | Not investigated |
| | | miR-124 | Sensitization to etoposide | p27 |
| miR-145 | | Sensitization to paclitaxel | Sp1, Cdk6 | |
| miR-186 | | Sensitization to cisplatin and EMT inhibition | Twist1 | |
| miRNAs as targets | miR-497 | Sensitization to cisplatin | mTOR, p70S6K1 | |
| | miR-506 | Sensitization to cisplatin and olaparib | RAD51 | |
| | miR-873 | Sensitization to cisplatin | ABCB1 | |
| | Anti-miRNA | miR-183 | Reduce tumor growth | Not investigated |
| miR-376a | | Reduce tumor growth | KLF15, Caspase-8 | |
| miR-383-5p | | Reduce tumor growth | Caspase-2 | |
| miR-551b-3p | | Reduce tumor growth | Not investigated | |
| miR-572 | | Reduce tumor growth | SOCs1, p21 | |
| miR-1207 | | Reduce tumor growth | SFRP1, Axin 2, ICAT | |
| Anti-miRNA + treatment | miR-551b | Sensitization to cisplatin | TRIM31, Foxo3 | |
| | miR-1307 | Sensitization to paclitaxel | ING5 | |

Клинические испытания мкРНК в качестве таргетной терапии

| Start-End | Treatment | Phase | Models | Enrollment | Results |
|-----------|-----------|--------------------|---|------------|---|
| Sep 2014 | TargomiR | Phase I Ongoing | Malignant pleural mesothelioma non-small cell lung cancer | 30 | Interim data indicates disease control was achieved in 5/6 patients after 8 weeks of protocol treatment Among the first 6 patients receiving 8 weekly doses, 1 patient with major objective response Well tolerated and shown to be safe in patients |
| Mar 2017 | | | | | Rapidly transient inflammatory symptoms (shivering, rigor, temperature elevation) and a short period of lymphopenia/neutrophilia Embark on Phase II studies, with a randomized controlled trial comparing TargomiRs with second- or third-line chemotherapy a preferred option |

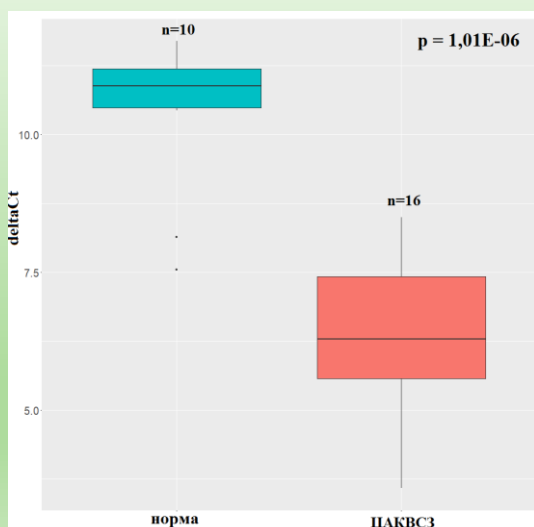
Эпителиально-мезенхимальный переход: ключевой механизм инвазии и метастазирования опухолевых клеток

Запуск программы ЭМП осуществляют ростовые факторы, синтезируемые в клетках стромы и активирующие различные сигнальные пути: TGF- β /BMP, WNT β catenin, Hedgehog, Notch и PI3K/AKT. Результатом активации данных путей является экспрессия репрессоров транскрипции E-кадгерина, осуществляющего межклеточную адгезию путем взаимодействия с β -катенином.



INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 50: 1461-1476, 2017

Анализ уровня экспрессии miR-101-3p в плазме крови в группах здоровых женщин и больных раком яичника (ЦАКВСЗ - цистаденокарцинома высокой степени злокачественности)



Нами впервые выявлено достоверное повышение уровня miR-101-3p в 20 раз в плазме крови больных ЦАКВСЗ по сравнению со здоровыми женщинами, что можно использовать в качестве диагностического теста данного заболевания.

По данным глубокого секвенирования настоящего исследования впервые выявлено достоверное снижение в 6 раз уровня экспрессии miR-101-3p ($p=1,78E-05$) в цистаденокарциноме яичника высокой степени злокачественности по сравнению с доброкачественной цистаденомой.

По литературным данным miR-101-3p индуцирует апоптоз, ингибирует пролиферацию, инвазию и метастазирование клеток рака молочной железы, повышает чувствительность трижды негативного рака молочной железы к паклитакселу [Li CY et al. Med Sci Monit. 2017;23:1857-1871].

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!