

Пономарева А.А.^{1*}, Боярко В.В.², Капитанова Д.В.², Зарубин А.А.³, Перельмутер В.М.¹,
Букреева Е.Б.², Чердынцева Н.В.^{1,4}, Денисов Е.В.¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии Томский НИМЦ, Томск, Россия

²ФГБОУ ВО Сибирский государственный университет, Томск, Россия

³Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томский НИМЦ, Томск, Россия

⁴Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Актуальность

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) представляет собой значительную социальную проблему. Общая распространенность ХОБЛ в мире среди людей в возрасте 40 лет и старше составляет до 12,64% (Al Wachami et al., 2024), на сегодняшний день это около 384 млн. пациентов, а по прогнозам к 2050 г. число болеющих ХОБЛ приблизится к 600 млн. (Boers et al., 2023). По данным статистики в России зарегистрировано 2,4 млн. пациентов с ХОБЛ, однако по данным эпидемиологических исследований распространенность ХОБЛ в РФ составляет 15,3%, т.е. общее количество больных ХОБЛ может достигать 11–14 млн. человек (Авдеев, 2024). Заболевание характеризуется высокой инвалидизацией, глобальная смертность составляет около 5–6%, в тяжелых стадиях — очень высокий риск летальности. Согласно современным представлениям о патогенезе рака легкого (РЛ), больных ХОБЛ включают в группу высокого риска и рекомендуют периодически проходить КТ-исследование для раннего выявления РЛ (Yang et al., 2021).

Предопухолевые изменения бронхиального эпителия (базальноклеточная гиперплазия, плоскоклеточная метаплазия, дисплазия), развивающиеся на фоне хронического воспаления при ХОБЛ, могут прогрессировать до малигнизации и приводить к развитию РЛ (Qi et al., 2022).

Обратимость эпигенетических изменений и возможность их целенаправленной регуляции делают их перспективными маркерами для оценки прогрессии предопухолевых изменений (Dai et al., 2021). При онкологических заболеваниях эпигенетические нарушения встречаются чаще, чем соматические мутации (Tulsyan et al., 2022), а их роль в развитии дисрегуляторных процессов и последующей малигнизации подчеркивает их маркерную значимость (Hu et al., 2021).

Ранее нами были обнаружены микроРНК (miR-492, miR-650, miR-487a, miR-1202, miR-634, miR-6132), уровень метилирования генов которых изменяется при переходе от плоскоклеточной метаплазии в бронхиальном эпителии к дисплазии и далее к опухоли (Ponomareva et al., 2024).

Цель исследования

Анализ профиля метилирования генов микроРНК, ассоциированных с предопухолевыми изменениями, в крови больных хронической обструктивной болезнью легких

Материалы и методы

Пациенты

В исследование были включены пациенты, находящиеся на момент забора материала в пульмонологическом отделении Городской клинической больницы № 3 им. Б.И. Альперовича, г. Томска. (n=22). Возраст - 40-70 лет, стадия заболевания - 3-4, курящие.

Проводимое обследование: оценивался статус курения, частота обострений и тяжесть симптомов ХОБЛ определялась по оценочному тесту COPD Assessment Test (CAT) и mMRC (modified Medical Research Council Dyspnea Scale). У всех пациентов определяли функцию внешнего дыхания, проводили спирометрию с обязательной оценкой постбронходилатационных показателей — ОФВ₁, ФЖЕЛ и соотношения ОФВ₁/ФЖЕЛ. Обследование проводилось в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями и рекомендациями ATS/ERS.

Все пациенты, включенные в исследование, подписывали добровольное информированное согласие.

В контрольную группу были включены здоровые доноры (n=10). Возраст на момент подписания информированного согласия составлял от 35 до 55 лет; отсутствие в анамнезе доброкачественных и злокачественных новообразований; отсутствие на момент проведения исследования обострений хронических заболеваний респираторного тракта.

Методы

Выделение геномной ДНК и бисульфитную конверсию проводили с использованием наборов Extract DNA Blood and Cells (Евроген, Россия) и наборов EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, США). Затем с помощью метил-специфичной ПЦП нарабатывали специфические фрагменты генов микроРНК.

Очистку полученных ампликонов проводили с помощью магнитных частиц фирмы “Sesana” (Россия). Ампликоны использовали для подготовки ДНК-библиотек с применением технологии “Shotgun” с помощью наборов фирмы “Sesana” (Россия).

Секвенирование полученных ДНК-библиотек проводили на платформе SurfSeq 5000, 2x 150 п.о., 1 млн прочтений на пул (Phred quality score - Q30).

Биоинформатический анализ

Обработку первичных данных метилирования выполняли с использованием программного обеспечения Illumina DRAGEN v3.9.5 по референсной сборке hg38. Анализ проводили для CpG-сайтов.

Для каждого CpG-сайта рассчитывали уровень метилирования (B-value) как отношение числа метилированных прочтений к общему числу прочтений в данной позиции: $B = M / (M + U)$, где M — число метилированных прочтений, U — число неметилированных прочтений. Для визуализации структуры данных и анализа кластеризации образцов использовали анализ главных компонент (PCA) на матрице B-значений после фильтрации по покрытию. Для выявления дифференциально метилированных CpG-сайтов β-значения преобразовывали в M-values по формуле $M = \log_2(\beta / (1 - \beta))$ и анализировали в пакете limma в среде R с использованием линейной модели, включившей факторы группы и гпу. Статистическую значимость оценивали с помощью эмпирически-модерированного t-критерия с поправкой на множественные сравнения по Бенджамини–Хокбергу; значимыми считали CpG-сайты при FDR < 0,05.

Результаты

В ходе ранее проведенного полногеномного анализа профиля метилирования предопухолевых изменений (базальноклеточной гиперплазии, плоскоклеточной метаплазии и дисплазии), а также опухолевых клеток, выявлены гены, кодирующие микроРНК, изменение уровня метилирования которых может быть ассоциировано с высоким риском малигнизации дисплазии бронхиального эпителия и развитием РЛ (Ponomareva et al., 2024).

Выявлены микроРНК-маркеры (miR-492, miR-650, miR-487a, miR-1202, miR-634, miR-6132), уровень метилирования генов которых изменяется при переходе от плоскоклеточной метаплазии в бронхиальном эпителии к дисплазии и далее к опухоли.

В связи с этим для дальнейшего анализа профиля метилирования были выбраны следующие гены: *MIR-492*, *MIR-487a*, *MIR-1202*, *MIR-634*, *MIR-6132*, *MIR-650*.

Результаты

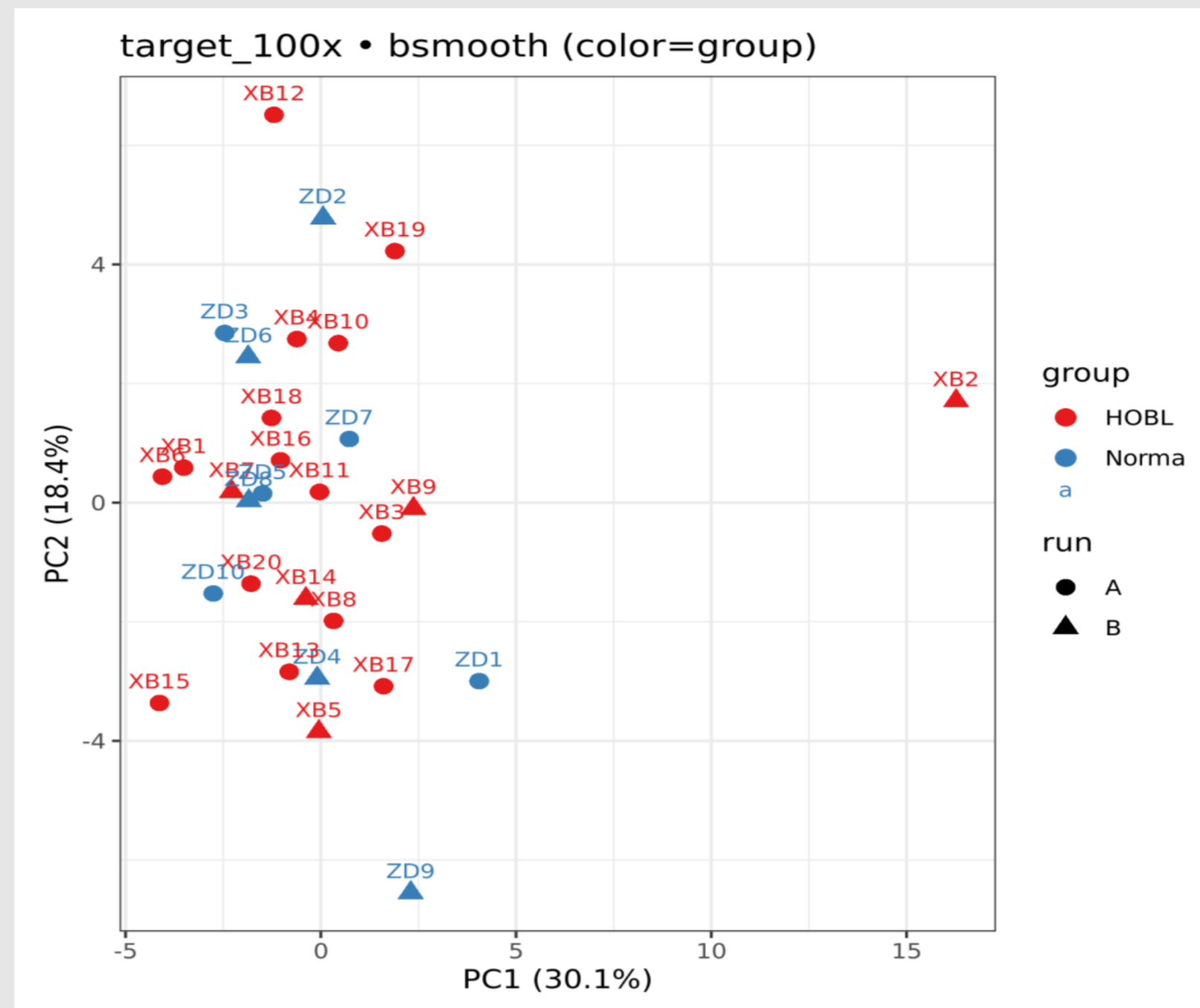


Рисунок 1. PCA-анализ уровня метилирования генов микроРНК для образцов венозной крови больных ХОБЛ и здоровых доноров.

Примечание: синим цветом - образцы от здоровых доноров, красным цветом - образцы от больных ХОБЛ, круги - 1-й запуск секвенирования, треугольники - 2-й запуск секвенирования.

В ходе PCA-анализа образцов ДНК венозной крови больных ХОБЛ и здоровых доноров показана высокая схожесть среднего уровня метилирования по исследуемым CpG-сайтам генов микроРНК (рис. 1).

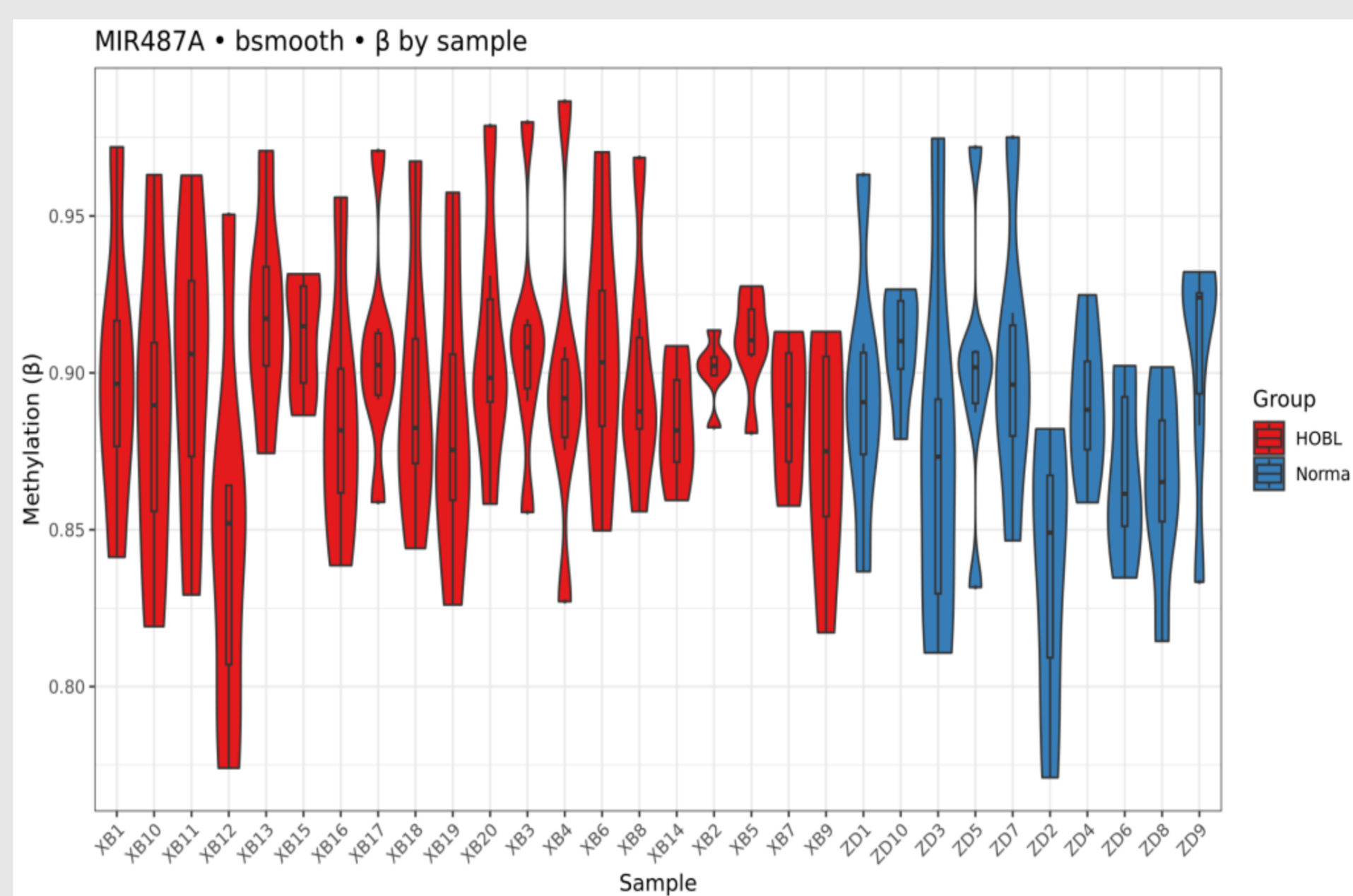


Рисунок 2. Профиль метилирования гена *MIR-487A* у больных ХОБЛ и здоровых доноров.

Примечание: По оси абсцисс - код пациента с ХОБЛ (XB №) или здорового донора (ZD №), по оси ординат - уровень метилирования (B-value), фигуры красным - образцы от больных ХОБЛ, фигуры синим - образцы от здоровых доноров.

○ - медиана; чем шире область фигуры, тем больше CpG у этого образца имеет близкое значение, чем уже, тем меньше CpG у этого образца имеет близкое значение.

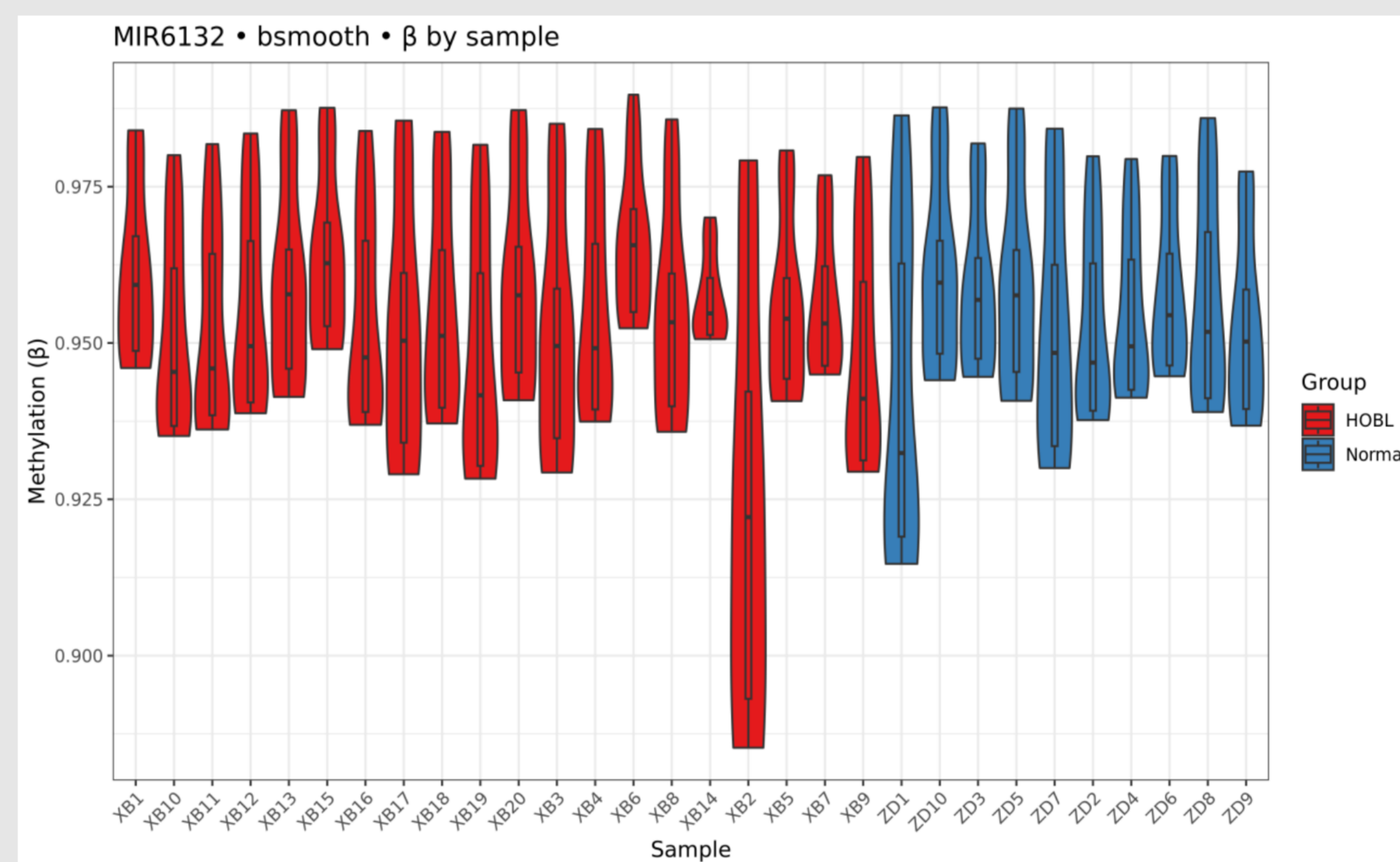


Рисунок 3. Профиль метилирования гена *MIR-6132* у больных ХОБЛ и здоровых доноров.

В результате анализа выявлены значимые различия между группами здоровых доноров и больных ХОБЛ по уровню метилирования отдельных CpG-сайтов для двух генов микроРНК: для гена *MIR-487A* (position_id:14:101051905+) (p value = 0,001), для гена *MIR-6132* (position_id:chr7:22822637+) (p value = 0,009) и различия на уровне тенденции для гена *MIR-650* (position_id:chr22:117019932+) (p value = 0,07).

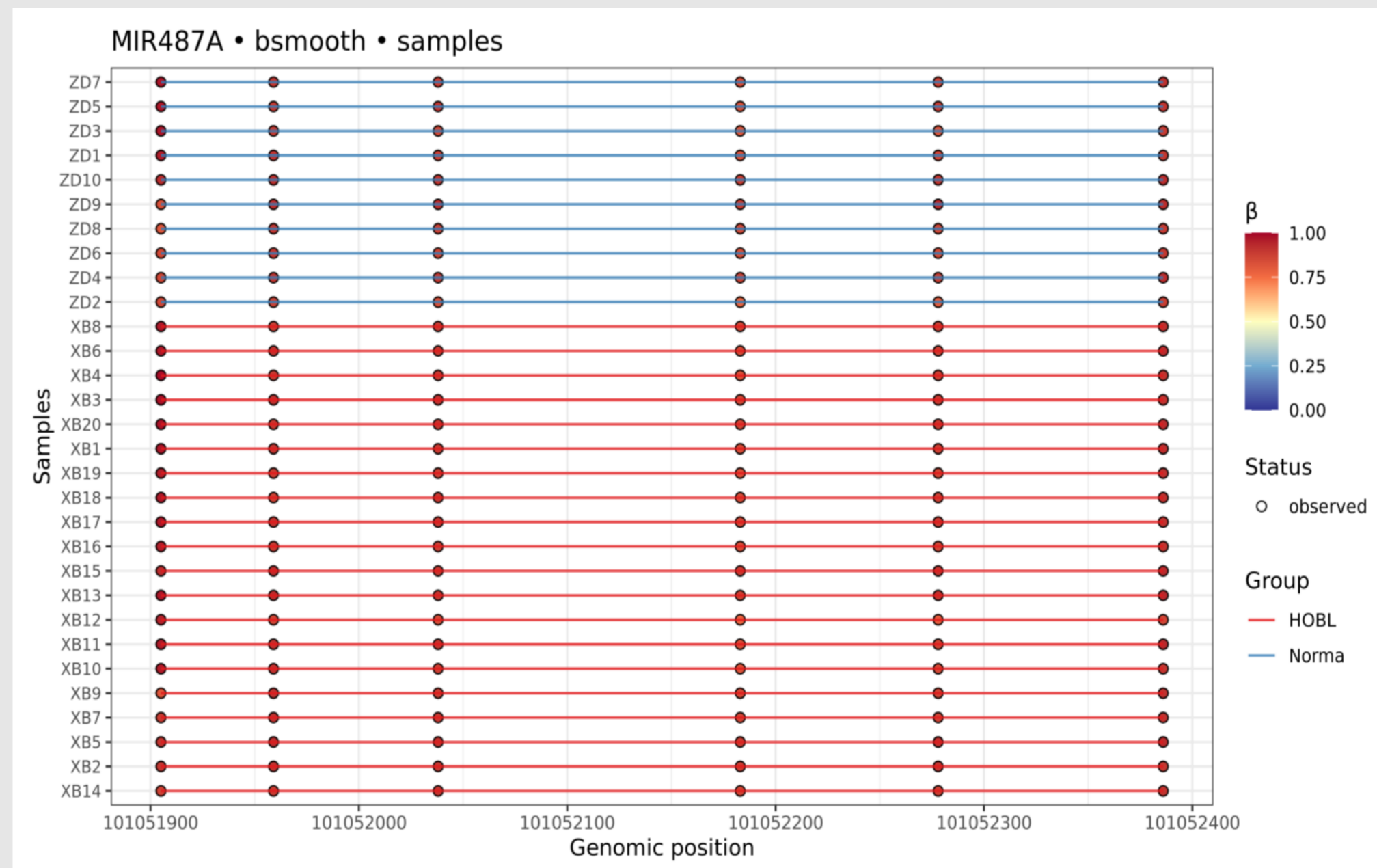


Рисунок 4. Характер метилирования отдельных CpG-сайтов в составе гена *MIR-487a* у больных ХОБЛ и здоровых доноров.

Для гена *MIR-487A* было охарактеризовано 6 CpG - сайтов (position_id chr14:1011051905+, chr14:101052038+, chr14:101052278+, chr14:101052386+, chr14:101052183+, chr14:101051959+).

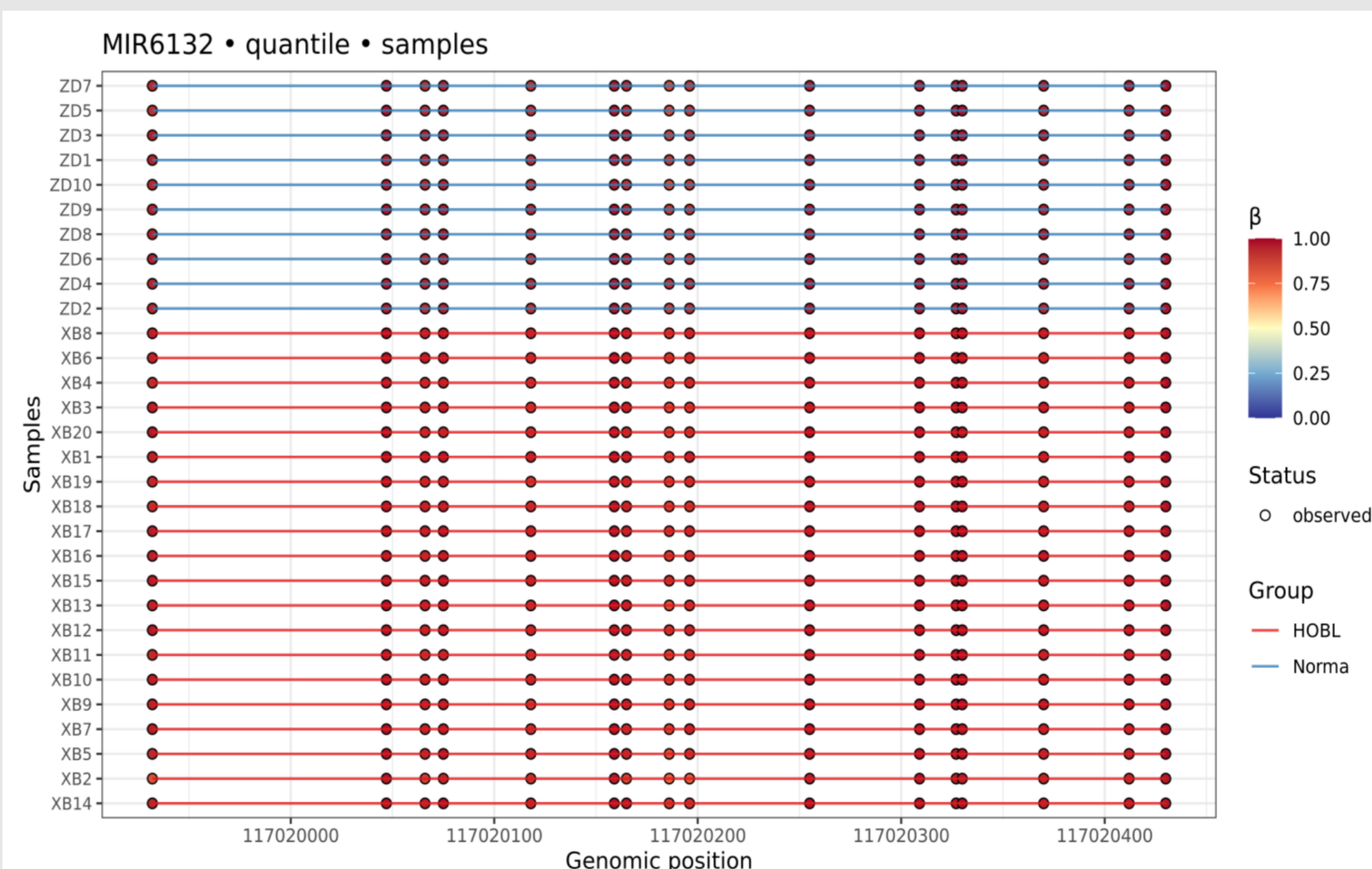


Рисунок 5. Характер метилирования отдельных CpG-сайтов в составе гена *MIR-6132* у больных ХОБЛ и здоровых доноров.

Для гена *MIR-6132* было охарактеризовано 16 CpG - сайтов (position_id chr7:117020047+, chr7:117020430+, chr7:117020066+, chr7:117020412+, chr7:117020075+, chr7:117020370+, chr7:117020118+, chr7:117020159+, chr7:117019932+, chr7:117020165+, chr7:117020330+, chr7:117020327+, chr7:117020186+, chr7:117020309+, chr7:117020196+, chr7:117020255+).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной значимости анализа уровня метилирования генов *MIR-487A* и *MIR-6132* в качестве маркеров предопухолевых состояний. Для подтверждения клинической значимости данных РНК-маркеров требуется дальнейшая валидация на независимой выборке больных ХОБЛ. Кроме того, важным представляется анализ ассоциации уровня метилирования генов *MIR-487A* и *MIR-6132* с результатами клинического мониторинга больных ХОБЛ (выявлены или не выявлены злокачественные новообразования легких).

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 25-25-00362 от 28.12.2024 г.