

# КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ 8 ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 3 И ГЕНА *MGMT* ПРИ ЛЮМИНАЛЬНОМ ТИПЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.А. Рябчиков<sup>1</sup>, И.К. Воротников<sup>1</sup>, Т.П. Казубская<sup>1</sup>, С.С. Лукина<sup>2</sup>,  
Е.А. Филиппова<sup>2</sup>, А.М. Бурденный<sup>2</sup>, В.И. Логинов<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;  
Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

<sup>3</sup>ФБГНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1

**Контакты:** Денис Анатольевич Рябчиков [dr.denisr@mail.ru](mailto:dr.denisr@mail.ru)

**Введение.** Эпигенетические изменения генов-супрессоров опухолевого роста рассматривают как наиболее тонкий и динамичный механизм регуляции генов, в том числе генов, вовлеченных в развитие рака молочной железы (РМЖ). Огромный интерес в изучении роли метилирования в патогенезе РМЖ представляют гены, расположенные на коротком плече хромосомы 3, и ген *MGMT* (10q26), для которых имеются крайне противоречивые данные об уровне их метилирования в опухолях.

**Цель исследования** — изучение роли метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* и *MGMT* в патогенезе эпителиальных опухолей молочной железы.

**Материалы и методы.** Образцы опухолевой и окружающей гистологически неизменной ткани от 174 больных РМЖ собраны и клинически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Анализ метилирования ДНК проводили с использованием 2 независимых методов. Метилирование генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* изучали с помощью полимеразной цепной реакции, специфичной к метилированному аллелю. Анализ метилирования промоторных районов генов *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1* и *NKIRAS1* выполняли с применением 2 метилчувствительных рестриктаз — *HpaII* и *HhaI* — и последующей полимеразной цепной реакции.

**Результаты.** Показана статистически значимо высокая частота метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* в эпителиальных опухолях молочной железы по сравнению с гистологически нормальной тканью от тех же пациенток. Выявлены значимые корреляции частоты метилирования генов *RARβ2* и *MGMT* с различными клинико-морфологическими характеристиками злокачественного процесса. Впервые показана статистически значимая связь между метилированием генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* и выживаемостью пациенток.

**Заключение.** Полученные данные об эпигенетических нарушениях при люминальном типе РМЖ дополняют «молекулярный портрет» этого вида рака и вносят вклад в понимание его патогенеза. Выявленные особенности метилирования исследованных генов могут найти клиническое применение для разработки современных подходов к прогнозированию, профилактике и выбору тактики лечения РМЖ у пациенток московского региона.

**Ключевые слова:** метилирование, промоторная область, CpG-островок, рак молочной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-38-45

## CLINICAL ASSESSEMENT OF THE 8 GENES ON CHROMOSOME 3 WITH ALSO *MGMT* GENE PROMOTER REGIONS METHYLATION STATUS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER LUMINAL HYSTOTYPE

D.A. Ryabchikov<sup>1</sup>, I.K. Vorotnikov<sup>1</sup>, T.P. Kazubskaya<sup>1</sup>, S.S. Lukina<sup>2</sup>, E.A. Filippova<sup>2</sup>, A.M. Burdenny<sup>2</sup>, V.I. Loginov<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;  
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

<sup>3</sup>Research Center of Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia

**Background.** Epigenetic changes of TSG are supposed as the most fine and active genes regulation mechanism in particular breast cancer (BC) genes pathway development. The most valuable results are awaited for methylation role of genes located on the short arm of chromosome 3 with also *MGMT* gene (10q26) in BC pathogenesis because of their ambiguous data for methylation status in tumors.

**Objective:** to illustrate the specific methylation role of the *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* and *MGMT* genes promoter regions in BC pathogenesis.

**Materials and methods.** Sample set of 174 BC patients consists of tumor and surrounding histologically normal tissue that were collected and clinically characterized in the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Two substantive methods were used to evaluate DNA methylation status. To analyse *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* and *MGMT* genes methylation we used polymerase chain reaction specific for the methylated allele. Whereas for analyses *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* promoter regions genes methylation status was used methyl sensitive restriction analyses with 2 methyl sensitive endonucleases *HpaII* and *HhaI* with subsequent polymerase chain reaction.

**Results.** A statistically significant high frequency of *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, and *MGMT* genes methylation in epithelial breast tumors compared with histologically normal tissue from the same patients was shown. Significant correlation of *RARβ2* and *MGMT* genes methylation frequency considering the different clinical and morphological characteristics of the malignant process was revealed. The statistically significant relationship between methylation of *RASSF1A*, *RARβ2* and *MGMT* genes and patient survival is shown for the first time.

**Conclusion.** The findings of epigenetic changes in the luminal BC supplement the “molecular picture” of this cancer and contribute to an understanding of its pathogenesis. The revealed features of investigated genes methylation can find clinical application for the development of modern approaches to prognosis, prevention and choice of tactics for treatment of BC in females of the Moscow region.

**Key words:** methylation, promoter region, CpG-island, breast cancer

## Введение

Несмотря на успехи в развитии клинической и экспериментальной онкологии, рак молочной железы (PMЖ) остается самым распространенным онкологическим заболеванием у женщин. Так, в России в год диагностируют более 53 тыс. новых случаев PMЖ. В Москве и Санкт-Петербурге эти показатели максимальные и составляют 52,3 и 48,1 на 100 тыс. женщин соответственно [1, 2]. По данным канцер-регистра в США на 2013 г., выявлено около 232 340 случаев PMЖ и зарегистрировано 39 620 летальных исходов от этой болезни [3]. На развитие данного заболевания оказывают влияние многие факторы, такие как образ жизни, гормональные, генетические и окружающие факторы среды, и, как известно, их канцерогенез является многоступенчатым процессом, включающим различные молекулярно-генетические изменения, в том числе эпигенетические нарушения в генах, ассоциированных с развитием опухоли. Большинство из них — гены «домашнего хозяйства», обеспечивающие поддержание нормального функционирования клетки, ее защиту от факторов внешней среды и поддержание целостности ее структуры [4]. Эпигенетическая модификация (метилование) регуляторных участков этих генов нарушает их взаимодействие с факторами транскрипции, блокируя эти участки с помощью белков, специфично связывающихся с метилированными CpG-парами (methyl CpG binding proteins), и, кроме того, вносит изменения в окружающий хроматин, переводя его в стабильно репрессированное состояние [5, 6]. К таким генам относятся *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1*, расположенные на коротком плече хромосомы 3 (рис. 1) и ген *MGMT* (10q26).

Ген *RASSF1A* располагается в кластере связанных с канцерогенезом генов в районе 3p21.31 [7]. Белковый продукт гена относится к цитоплазматическим

белкам. Выявлено многообразие функций этого белка в клетке, например задержка клеточного цикла в фазе G1/S-перехода, влияние на содержание циклина D1 и фосфорилирование белка pRb [8]. Белок гена *RASSF1A* вовлечен также в индукцию апоптоза и стабилизацию микротрубочек [9]. Метилирование гена *RASSF1A* в опухолях различной локализации рассматривают как способ подавления его супрессорной функции при онкогенезе [10]. Похожая ситуация и с геном *SEMA3B*, расположенным в районе 3p21.31 [11].

Ген *RHOA* принимает участие в процессах формирования актинового цитоскелета, выполняет

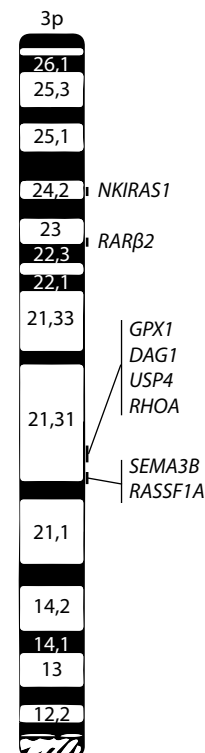


Рис. 1. Расположение исследованных генов на 3p

важную роль в подвижности и адгезии клеток. Данный ген может вызывать экзогенно трансформацию клеток как *in vitro*, так *in vivo*. Предполагается, что *RHOA* участвует в инвазии и метастазировании опухолей [12]. Активация его экспрессии в эпителиальных опухолях может быть связана как с частичным деметилированием, так и с амплификацией локуса [13, 14]. Эти результаты согласуются с данными об онкогенном потенциале гена и его участии в инвазии [15].

Ген *DAG1* кодирует дистрогликан — белок адгезии, который состоит из 2 субъединиц (трансмембранной и внеклеточной) и выполняет взаимосвязь внеклеточного матрикса с цитоскелетом. Описаны связи адгезии клеток с дистрогликаном, инвазией и метастазированием опухолей [16].

Ген *GPX1* является наиболее распространенным членом семейства глутатионпероксидаз. Этот белок локализован в митохондриях, ядре и цитоплазме. Данный антиоксидантный селенопротеин играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса и разрушения. Показано снижение уровней белкового продукта и матричной РНК в опухолях, и выявлена способность *GPX1* подавлять рост эндотелиальной линии клеток ECV304 [17]. В недавно опубликованных исследованиях других авторов, выполненных на клеточных линиях РМЖ и образцах опухолей у больных раком желудка, также продемонстрирована роль метилирования в регуляции *GPX1* [18, 19]. Эти результаты согласуются с данными об опухолесупрессорной активности гена [17].

Ген *USP4* кодирует убиквитинспецифическую протеазу 4-го типа, которая отщепляет убиквитин и на время останавливает процесс протеолитической деградации регуляторных белков, включая p27, p53, циклины, pRb, NF-κB, транскрипционные факторы E2F, c-jun, c-fos, онкогены *c-myc* и Ser/Thr-киназу c-mos. Описано повышение уровня матричной РНК *USP4* при раке легкого [20].

Ген *RARβ2* (3p23 — p22.3) относится к суперсемейству ядерных рецепторов, которые служат лигандактивирующими транскрипционными факторами [21]. Лигандами для рецепторов класса RAR являются ретиноиды — витамин А и его биологически активные метаболиты. Представлены данные о том, что метилирование 5'-области и экзона 1 гена *RARβ2* сопровождается подавлением транскрипции гена в эпителиальных опухолях различных локализаций, в том числе при РМЖ [22].

Ген *NKIRAS1* является гомологом онкогена *Ras*, который взаимодействует с фактором некроза NF-κB. Белковый продукт гена может функционировать как G-белки, проявляющие GTPазную активность. Данный ген принимает участие в регуляции деградации IκB и вместе с IκB может подавлять актив-

ность NF-κB [23]. *NKIRAS1* идентифицирован с помощью гибридизации Not1-микрочипов в поиске генов, подверженных делециям, метилированию и амплификациям, как наиболее распространенная мишень структурных изменений такого типа в различных локализациях эпителиальных опухолей [8].

Ген *MGMT* кодирует фермент Об-метилгуанин-метилтрансфераза, участвующий в прямой репарации ДНК. Данный фермент выполняет активирующую функцию переноса метильной группы от Об-метилгуанина к остатку цистеина, что помогает восстановить нормальную структуру ДНК после вызванного алкильными соединениями повреждения [24]. В ряде работ обнаружено, что гиперметилирование CpG-островка *MGMT* взаимосвязано с инактивацией его транскрипции и, как правило, сопровождается перестройкой хроматина в неактивное состояние [25].

Одними из причин низкой выживаемости больных РМЖ являются бессимптомное течение на ранних стадиях, отсутствие достаточно эффективной диагностики заболевания и его устойчивость к химиотерапии. Известно, что нарушение паттерна метилирования ДНК наблюдается на всех стадиях канцерогенеза, что может быть использовано для диагностики и прогноза злокачественных опухолей [26].

В настоящей работе представлены результаты изучения метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* и *MGMT* в эпителиальных опухолях молочной железы. Определена частота метилирования промоторных районов (т.е. доля образцов, в которых наблюдали метилирование), и показана достоверная корреляция частоты метилирования этих районов с прогрессированием РМЖ.

#### Материалы и методы

Исследование проводили на выборке из 174 пациенток с РМЖ, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Также использовали выборку здоровых женщин в качестве контрольной группы. У 6 (3,6 %) больных РМЖ наблюдалось билатеральное поражение, поэтому мы дополнительно анализировали результаты с учетом этого фактора. Больные описаны в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически на основании классификации Всемирной организации здравоохранения [27, 28]. У 127 (75,6 %) пациенток выявлен люминальный гистологический тип опухоли.

Всем больным на материале удаленной опухоли проведены рутинное гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Во всех случаях одним

морфологом был выполнен пересмотр гистологических препаратов операционного материала, хранящихся в архиве патологоанатомического отделения: проведено уточнение гистологического типа опухоли и степени дифференцирования в соответствии с действующей классификацией опухолей молочной железы Всемирной организации здравоохранения (2013). Во всех случаях сделано иммуногистохимическое исследование экспрессии андрогеновых и эстрогеновых рецепторов, прогестерона, эпидермального фактора роста 2-го типа (Her2/neu) и пролиферативной активности опухоли (индекс Ki-67). Данные по числу образцов представлены в табл. 1.

Исследование выполняли на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к эстрогеновым рецепторам  $\alpha$  (SP1, Cell Marque), прогестерону (SP42, Cell Marque), андрогеновым рецепторам (F39.4.1, Biogenex), Her2/neu (Herceptest, Dako) и Ki-67 (MIB1, Dako). Срезы толщиной 3–4 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Оценку реакции гормональных рецепторов проводили в опухоли полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антигенположительных клеток [29].

Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани молочной железы по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Качество и концентрацию ДНК проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

**Анализ метилирования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и бисульфитной модификации ДНК.** Метилирование генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR $\beta$ 2* и *MGMT* изучали с помощью ПЦР, специфич-

ной к метилированному аллелю (метилспецифичная ПЦР). Данный метод основан на бисульфитной конверсии ДНК, которая достигается взаимодействием молекул гидросульфита с цитозином с превращением последнего в урацил. В дальнейшем осуществляется амплификация исследуемого фрагмента ДНК с помощью ПЦР. При этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин, и только 5-метилцитозин воспроизводится как цитозин [30]. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР взяты из выполненных ранее работ [31, 32].

**Анализ метилирования промоторных районов генов *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1*** проводили с применением метилчувствительной реакции. Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованными участки, содержащие 5-метилцитозин. ДНК последовательно гидролизовали с 2 метилчувствительными рестриктазами *HpaII* (CCGG) и *HhaI* (GCGC) (Fermentas – Thermo Fisher Scientific, США) в условиях, приведенных в протоколах фирмы-изготовителя, и использовали в качестве матрицы для ПЦР. Для амплификации применяли 2,5 мкл гидролизованной ДНК. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР взяты из ранее выполненных работ [14].

Продукты ПЦР исследуемых и контрольных фрагментов генов разделяли одновременно путем электрофореза в 10 % полиакриламидном геле.

**Статистический анализ** данных проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0,05. Конкордантность данных по метилированию оценивали с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Значимость корреляции по Спирмену ( $R_s$ ) проверяли с помощью t-теста Стьюдента. Отсчет безрецидивной выживаемости определялся с использованием метода Каплана–Майера и системы для статистического анализа данных SPSS 20.0.

### Результаты и обсуждение

Известно, что CpG-островки генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR $\beta$ 2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* и *MGMT* перекрывают 5' – область гена, включая старт транскрипции и участок промоторной области. У гена *GPX1* CpG-островок охватывает промоторную область и весь ген. Статус метилирования CpG-островков указанных генов изучен на выборке из 174 парных образцов опухоль/неизмененная ткань у больных РМЖ, данные по частотам метилирования представлены в табл. 2. Обнаружено, что при оценке метилирования генов *SEMA3B*, *RASSF1A*, *RAR $\beta$ 2* и *MGMT* их частота в опухолевой ткани составила

**Таблица 1.** Патоморфологические характеристики образцов люминального РМЖ

Фактор	n
Морфологическая форма:	
протоковый	104
дольковый	10
смешанный	14
редкая	5
Her2/neu:	
нет	108
есть	25
Ki-67:	
нет	68
есть	65
Андрогены:	
нет	6
есть	59



Таблица 2. Частота метилирования генов в опухоли и гистологически нормальной ткани молочных желез

Ген	Опухолевая ткань		Нормальная ткань	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>RASSF1A</i> ( <i>n</i> = 174)	55	31,6*	1	0,6
<i>SEMA3B</i> ( <i>n</i> = 174)	66	37,9*	12	6,9
<i>RARβ2</i> ( <i>n</i> = 174)	50	28,7*	9	5,2
<i>MGMT</i> ( <i>n</i> = 174)	23	13,2*	0	0
<i>USP4</i> ( <i>n</i> = 92)	21	22,8	14	15,2
<i>GPX1</i> ( <i>n</i> = 92)	18	19,6	10	10,9
<i>RHOA</i> ( <i>n</i> = 92)	12	13,0	8	8,7
<i>DAG1</i> ( <i>n</i> = 92)	19	20,7	15	16,3
<i>NKIRAS1</i> ( <i>n</i> = 92)	26	28,3	23	25,0

\*Различия достоверны по сравнению с нормальной тканью ( $p < 0,0001$ ).

37,9; 31,6; 28,7 и 13,2 % соответственно, и во всех случаях была значимо выше, чем в образцах гистологически нормальной ткани ( $p < 0,0001$ ). Отмечено, что частота метилирования изучаемых генов весьма близка или совпадает с опубликованными результатами мировых исследований [33]. В то же время изменение статуса метилирования CpG-островков генов *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *DAG1* и *NKIRAS1* выявлено в меньшем количестве случаев (см. табл. 2) и различия в частоте метилирования в опухолевой и прилежащей гистологически нормальной ткани статистически незначимы.

Отметим, что у 133 из 174 пациенток был диагностирован люминальный подтип РМЖ, при этом у 6 больных зарегистрировано двухстороннее поражение молочных желез. По этой причине исследуемые пациентки были разделены на 3 независимые группы по подтипам РМЖ: люминальный РМЖ ( $n = 133$ ), Erb-B2 ( $n = 13$ ) и трижды негативный РМЖ ( $n = 28$ ). Был проведен анализ статуса метилирования для каждой группы, для того чтобы установить значимость более «тяжелых» форм РМЖ в патогенезе заболевания. Также проанализирована частота метилирования исследуемых генов в группе с люминальным подтипом РМЖ, чтобы оценить сохранение изменения статуса метилирования в опухоли по сравнению с гистологически нормальной тканью и подтвердить связь люминального гистологического типа РМЖ с изменением статуса метилирования исследованных генов и, соответственно, с патогенезом заболевания. Статистически значимых различий в изменении метилирования исследованных генов в зависимости от типа РМЖ не найдено. При этом сравнение внутри отдельных групп РМЖ показало, что изменение частоты метилирования генов

*RASSF1A* (30,8 %;  $p = 0,00001$ ), *SEMA3B* (38,3 %;  $p = 0,00001$ ), *MGMT* (11,3 %;  $p = 0,00001$ ) и *RARβ2* (27,1 %;  $p = 0,00001$ ; рис. 2) в опухоли статистически значимо выше, чем в прилежащей нормальной ткани при люминальном подтипе РМЖ. Результаты мировых исследований противоречивы, и наши данные могут оказаться интересными для понимания роли генов хромосомы 3 в развитии люминального подтипа РМЖ.

Для оценки вклада метилирования исследованных генов в развитие отдельных подтипов люминального РМЖ выборка из 133 случаев люминального РМЖ была разделена на 3 независимые подгруппы: люминальный подтип А ( $n = 61$  (45,9 %)), люминальный Her2/neu<sup>-</sup> подтип Б ( $n = 47$  (35,3 %)) и люминальный Her2/neu<sup>+</sup> подтип Б ( $n = 25$  (18,8 %)). Данные по частотам метилирования исследованных генов представлены в табл. 3.

Отметим, что статистически значимых различий в частоте метилирования промоторных CpG-островков генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RHOA*, *GPX1*,



Рис. 2. Уровень метилирования генов в образцах люминального РМЖ и нормальной ткани молочных желез

Таблица 3. Уровень метилирования генов в зависимости от подтипа люминального РМЖ

Ген	Подтип А		Подтип Б Her2neu <sup>-</sup>		Подтип Б Her2/neu <sup>+</sup>	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>RASSF1A</i>	19	31,1	15	31,9	7	28,0
<i>SEMA3B</i>	22	36,1	18	38,3	11	44,0
<i>RARβ2</i>	10	16,4	15	31,9*	11	44,0*
<i>MGMT</i>	2	3,3	8	17,0*	5	20,0*
<i>USP4</i>	8	24,2	6	24,0	4	30,8
<i>GPX1</i>	6	18,2	4	16,0	5	38,5
<i>RHOA</i>	6	18,2	4	16,0	1	7,7
<i>DAG1</i>	7	21,2	5	20,0	3	23,1
<i>NKIRAS1</i>	9	27,3	5	20,0	4	30,8

\*Различия достоверны по сравнению с подтипом А при  $p < 0,05$ .

*USP4*, *DAG1* и *NKIRAS1* при сравнении разных подтипов люминального РМЖ не найдено. При этом уровень частоты метилирования генов *MGMT* и *RARβ2* в образцах РМЖ подтипа А был статистически значимо меньше ( $p < 0,05$ ), чем в обоих подтипах Б (см. табл. 3). Так, частота метилирования *RARβ2* была 16,4 %, что в 2 и 3 раза меньше, чем у подтипов Б Her2/neu<sup>-</sup> и Her2/neu<sup>+</sup>. Частота метилирования для гена *MGMT* была в 5 и 6 раз ниже по сравнению с подтипами Б Her2/neu<sup>-</sup> и Her2/neu<sup>+</sup>. Полученные результаты указывают на связь этих генов с развитием люминального РМЖ подтипа Б, что согласуется с данными литературы [33–35]. Это позволяет рассматривать данные гены как молекулярные маркеры неблагоприятного прогноза РМЖ.

Нами был проанализирован статус метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* с учетом патоморфологических характеристик люминального РМЖ (см. табл. 1). Показано, что в группе больных с гиперэкспрессией Her2 уровень метилирования *RARβ2* значимо выше, чем в группе с Her2<sup>-</sup> (44 % против 23,1 %;  $p < 0,05$ ). Повышенный уровень Ki-67 статистически значимо ассоциирован с метилированием генов *MGMT* (20 % против 2,9 %;  $p < 0,05$ ) и *RARβ2* (38,5 % против 16,2 %;  $p < 0,05$ ).

Нами изучена корреляция среднего уровня смертности и выживаемости пациенток со статусом метилирования в зависимости от уровня метилирования 9 исследованных генов. Среднее время наблюдения составило  $98,75 \pm 53,36$  мес (4,10–208,06 мес, медиана 100,6 мес). За этот период 22 (17,3 %) из 127 пациенток умерли, прогрессия зарегистрирована у 30 (23,6 %). Анализ смертности больных люминальным РМЖ в зависимости от метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *MGMT*, *USP4*, *GPX1*,

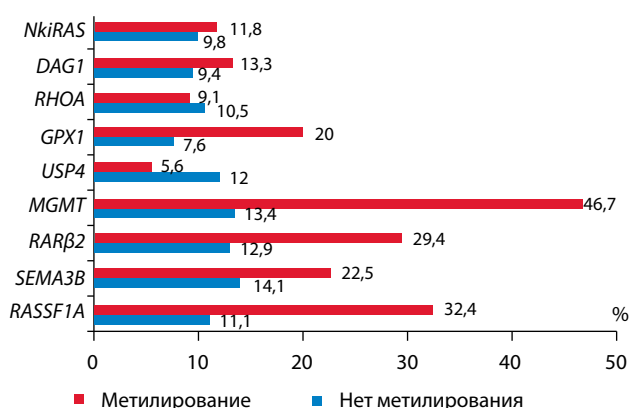


Рис. 3. Частота смертности больных люминальным РМЖ в зависимости от метилирования 9 исследованных генов

*RHOA*, *DAG1* и *NKIRAS1* показал достоверную корреляцию для 3 генов: *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* (рис. 3). Для *RASSF1A* уровень смертности увеличился в 2,9 раза, для *RARβ2* — в 2,3 раза и для *MGMT* — в 3,5 раза.

Тенденция к снижению общей выживаемости больных с метилированием генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* начала выявляться уже через год (рис. 4). Так, 5- и 10-летняя выживаемость больных без метилирования *RASSF1A* составила 93,5 и 85,5 %, с метилированием эти показатели достоверно ниже — 80,3 и 65,3 % соответственно ( $p = 0,007$ ; см. рис. 4а). У больных без метилирования *RARβ2* 5- и 10-летняя выживаемость — 91,3 и 83,7 %, с метилированием показатели достоверно ниже — 84,3 и 67,2 % соответственно ( $p = 0,038$ ; см. рис. 4б). У пациентов с метилированием *MGMT* 5- и 10-летняя выживаемость — 92,9 и 84,1 %, с отсутствием метилирования достоверно ниже — 63,8 и 42,5 % соответственно ( $p = 0,0008$ ; см. рис. 4в). Выявленная нами связь

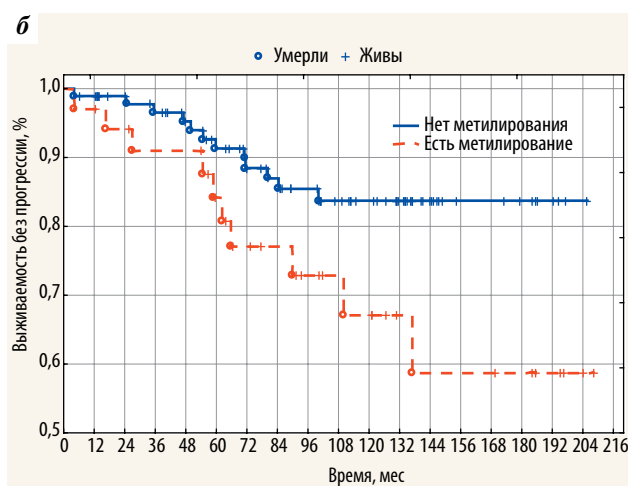
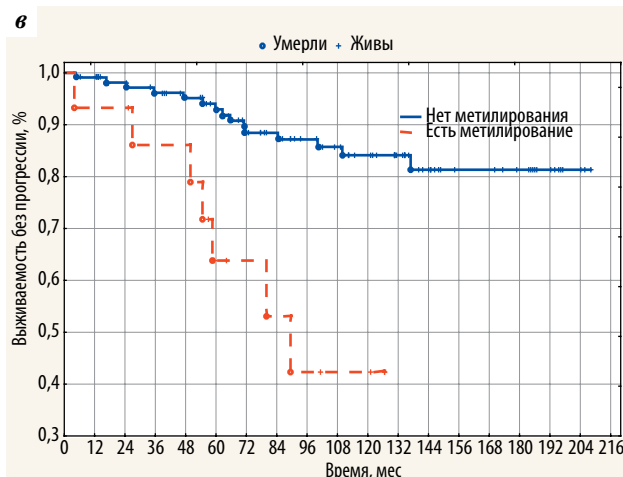
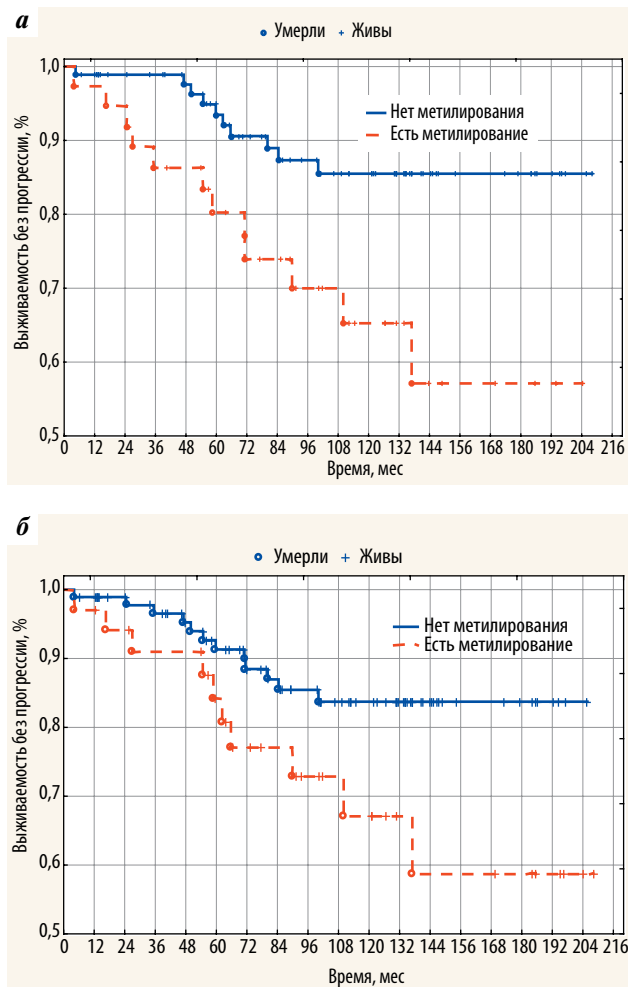


Рис. 4. Общая выживаемость больных люминальным РМЖ в зависимости от метилирования генов *RASSF1A* (а), *RARβ2* (б), *MGMT* (в)

метилирования гена *RASSF1A* с выживаемостью пациенток с люминальным РМЖ согласуется с данными зарубежных исследователей [36].

### Заключение

Таким образом, в настоящей работе изучено метилирование промоторных районов 9 генов у больных РМЖ, проживающих в Москве и Московской области. Показана статистически

значимо высокая частота метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* в эпителиальных опухолях молочной железы по сравнению с гистологически нормальной тканью от тех же пациенток. Выявлены значимые корреляции частоты метилирования генов *RARβ2* и *MGMT* с различными клинико-морфологическими характеристиками злокачественного процесса. Впервые продемонстрированы связь метилирования промоторных районов этих генов с люминальным фенотипом Б и статистически значимая связь метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* с выживаемостью пациенток.

Полученные данные об эпигенетических нарушениях при люминальном типе РМЖ дополняют «молекулярный портрет» этого вида рака и вносят вклад в понимание его патогенеза. Выявленные особенности метилирования исследованных генов могут найти клиническое применение для разработки современных подходов к прогнозированию, профилактике и выбору тактики лечения РМЖ у пациенток московского региона.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-000654).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015. С. 5–11.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2010;21(S2):52–86.
3. Safarpour D., Tavassoli F.A. A targetable androgen receptor-positive breast cancer subtype hidden among the triple-negative cancers. Arch Pathol Lab Med 2015;139(5):612–7. DOI: 10.5858/arpa.2014-0122-RA. PMID: 25310144.
4. Buganim Y., Rotter V. p53: balancing tumour suppression and implications for the clinic. Eur J Cancer

- 2009;45(Suppl 1):217–34.  
DOI: 10.1016/S0959-8049(09)70037-1.  
PMID: 19775621.
5. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16(1):6–21. DOI: 10.1101/gad.947102. PMID: 11782440.
  6. Prokhortchouk E., Hendrich B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene* 2002;21(35):5394–9. DOI: 10.1038/sj.onc.1205631. PMID: 12154402.
  7. Zabarovsky E.R., Senchenko V., Loginov V. et al. Positional cloning of tumor suppressor genes from 3p21.3 involved in major human cancers. In book: *Horizons in Cancer Research*. Ed. F. Columbus. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, 42, chapter 4. Pp. 103–127.
  8. Dmitriev A.A., Kashuba V.I., Haraldson K. et al. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics* 2012;7(5):502–13. DOI: 10.4161/epi.19801. PMID: 22491060.
  9. Agathangelou A., Cooper W.N., Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005;65(9):3497–508. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4088. PMID: 15867337.
  10. Kashuba V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S. et al. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13(10):13352–77. DOI: 10.3390/ijms131013352. PMID: 23202957.
  11. Брага Э.А., Ходырев Д.С., Логинов В.И. и др. Метилирование в регуляции экспрессии генов хромосомы 3 и генов микроРНК при светлоклеточном почечно-клеточном раке. *Генетика* 2015;51(6):668–74.
  12. Horiuchi A., Imai T., Wang C. et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest* 2003;83(6):861–70. PMID: 12808121.
  13. Ходырев Д.С., Логинов В.И., Пронина И.В. и др. Изменение метилирования генов из критичных районов хромосомы 3 в эпителиальных опухолях. *Молекулярная медицина* 2011;1:3–10.
  14. Логинов В.И., Пронина И.В., Бурденный А.М. и др. Роль метилирования в регуляции экспрессии функционально значимых генов хромосомы 3: *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* – в опухолях молочной железы. *Молекулярная медицина* 2014;6:30–7.
  15. Ma L., Liu Y.P., Geng C.Z. et al. Overexpression of Rhoa is associated with progression in invasive breast duct carcinoma. *Breast J* 2010;16(1):105–7. DOI: 10.1111/j.1524-4741.2009.00860.x. PMID: 19912238.
  16. Brennan P.A., Jing J., Ethunandan M., Gorecki D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(6):589–92. DOI: 10.1016/j.ejso.2004.03.014. PMID: 15256230.
  17. Faucher K., Rabinovitch-Chable H., Barriere G. et al. Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges. *Biochimie* 2003;85(6):611–7. PMID: 12829378.
  18. Min S.Y., Kim H.S., Jung E.J. et al. Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer. *Anticancer Res* 2012;32(8):3169–75. PMID: 22843889.
  19. Kulak M.V., Cyr A.R., Woodfield G.W. et al. Transcriptional regulation of the *GPX1* gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene* 2013;32(34):4043–51. DOI: 10.1038/onc.2012.400. PMID: 22964634.
  20. Hwang S.J., Lee H.W., Kim H.R. et al. Ubiquitin-specific protease 4 controls metastatic potential through  $\beta$ -catenin stabilization in brain metastatic lung adenocarcinoma. *Sci Rep* 2016;6:21596. DOI: 10.1038/srep21596. PMID: 26883469.
  21. Xu X.C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett* 2007;253(1):14–24. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.019. PMID: 17188427.
  22. Wu L., Shen Y., Peng X. et al. Aberrant promoter methylation of cancer-related genes in human breast cancer. *Oncol Lett* 2016;12(6):5145–55. DOI: 10.3892/ol.2016.5351. PMID: 28105221.
  23. Chen Y., Vallee S., Wu J. et al. Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. *Mol Cell Biol* 2004;24(7):3048–56. DOI: 10.1128/MCB.24.7.3048-3056.2004. PMID: 15024091.
  24. Sato A., Sunayama J., Matsuda K.I. MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 2011;29(12):1942–51. DOI: 10.1002/stem.753. PMID: 21957016.
  25. Abouzeid H.E., Kassem A.M., Abdel Wahab A.H. et al. Promoter hypermethylation of *RASSF1A*, *MGMT*, and *HIC-1* genes in benign and malignant colorectal tumors. *Tumour Biol* 2011;32(5):845–52. DOI: 10.1007/s13277-011-0156-7. PMID: 21274674.
  26. Kulis M., Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70:27–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. PMID: 20920744.
  27. Sobin L.Y., Wittekind Ch. *UICC – TNM classification of malignant tumours*. New York: Wiley-Liss, 2002. Pp. 193–195.
  28. World health organization classification of tumours. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Eds.: F.A. Tavassoli, P. Devilee. Lyon: IARC Press, 2003.
  29. Lester S.C., Bose S., Chen Y.Y. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(10):1515–38. DOI: 10.1043/1543-2165-133.10.1515. PMID: 19792042.
  30. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acids Res* 1994;22(15):2990–7. PMID: 8065911.
  31. Казубская Т.П., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др. Метилирование генов *RASSF1A*, *RAR $\beta$* , *SEMA3B* в эпителиальных опухолях молочной железы, яичников и полинеоплазии. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2012;1(12):61–9.
  32. Бурденный А.М., Челышева Д.С., Ходырев Д.С. и др. Роль гиперметилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT* в развитии рака молочной железы и яичников. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2015;26(2):39–44.
  33. Feng W., Shen L., Wen S. et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007;9(4):R57. DOI: 10.1186/bcr1762. PMID: 17764565.
  34. Park S.Y., Kwon H.J., Choi Y. et al. Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod Pathol* 2012;25(2):185–96. DOI: 10.1038/modpathol.2011.160. PMID: 22037257.
  35. Asiaf A., Ahmad S.T., Malik A.A. et al. Protein expression and methylation of MGMT, a DNA repair gene and their correlation with clinicopathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol* 2015;36(8):6485–96. DOI: 10.1007/s13277-015-3339-9. PMID: 25820821.
  36. Xu J., Shetty P.B., Feng W. et al. Methylation of *HIN-1*, *RASSF1A*, *RIL* and *CDH13* in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only *RASSF1A* methylation is associated with outcome. *BMC Cancer* 2012;12:243. DOI: 10.1186/1471-2407-12-243. PMID: 22695491.