

УДК 618.19-006.6-07:575

А.Е. Силин<sup>1</sup>, В.Н. Мартинков<sup>1</sup>,  
Э.А. Надыров<sup>1</sup>, С.М. Мартыненко<sup>1</sup>,  
Д.Б. Родько<sup>2</sup>

## ЧАСТОТЫ ГИПЕРМЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

<sup>2</sup>У «Гомельский областной клинический онкологический диспансер», г. Гомель, Беларусь

В статье приводятся результаты молекулярно-генетического анализа гиперметилирования промоторных областей 9 генов-супрессоров: RASSF1A, HIN1, DAPK, APC, Cyclin D2, RAR $\beta$ , GSTP1, p16 и hMLH1 в группе из 82 пациенток с диагнозом рак молочной железы. Показано, что гиперметилирование хотя бы по одному гену присутствует в 90,2% случаев рака молочной железы. Наиболее информативными оказались 5 из 9 анализируемых генов: RASSF1A, Cyclin D2, APC, RAR $\beta$  и DAPK, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для формирования диагностической панели маркеров. По ряду генов выявлена значимая связь частот гиперметилирования с клинико-морфологическими характеристиками рака молочной железы.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, гиперметилирование генов-супрессоров, полимеразная цепная реакция

### Введение

В настоящее время решение вопросов о роли генетического фактора в возникновении различных онкологических заболеваний связывают с открытиями в области молекулярной генетики, благодаря чему появилась возможность выявить гены, модификации которых сопряжены с развитием злокачественных новообразований молочной железы. Известно, что значительная роль в онкогенезе принадлежит генам-супрессорам. Наряду с мутационными событиями, приводящими к нарушениям их нормального функционирования, в последнее время большое внимание уделяется фактам эпигенетической модификации ДНК, к числу которых относится гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров.

Исследования последнего десятилетия показали, что эпигенетическая инактивация генов-супрессоров опухоли, обусловленная гиперметилированием промоторной области, является таким же характерным признаком опухолей человека, как и генетические нарушения, и служит альтернативным механизмом потери функции

генов-супрессоров [1-3]. Как было установлено в ряде исследований, гиперметилирование генов-супрессоров сопровождается такими опухолевыми процессами, как рак предстательной железы, рак печени, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак щитовидной железы и злокачественные новообразования некоторых других локализаций [4-8]. Существуют данные о фактах гиперметилирования при раке молочной железы (РМЖ) [9-11]. При этом авторы в своих исследованиях анализируют от одного до десяти различных генов, обладающих различной степенью сопряженности случаев гиперметилирования с заболеванием. В этой связи актуальным является подбор наиболее чувствительных эпигенетических маркеров для каждой из форм онкологических заболеваний с целью разработки методов ранней диагностики злокачественного процесса.

**Целью исследования** явилось проведение анализа распространенности гиперметилирования промоторных областей 9 различных генов-супрессоров в группе пациенток с РМЖ и оценка сопряженности эпигенетических модификаций с клинико-морфологическими характеристиками.

### **Материалы и методы исследования**

*Группа исследования и пробоподготовка.* Группа исследования была сформирована из 82 женщин, проходивших лечение в Гомельском областном клиническом онкологическом диспансере в 2009 г. Средний возраст пациенток в группе исследования варьировал от 37 до 79 лет. В качестве материала для молекулярно-генетического анализа были использованы образцы опухолевой ткани. Образцы отбирались только после получения письменного информированного согласия на исследование. Проводился опрос каждой исследуемой женщины в соответствии с разработанной анкетой, включающей вопросы как общего характера (ФИО, дата рождения, место жительства), так и направленные на выяснение семейного анамнеза онкозаболеваний, если таковые имеются. Также в анкету вносились клиничко-морфологические характеристики опухоли.

Выделение ДНК из опухолевой ткани проводилось с использованием набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Дополнительно к набору были использованы хлороформ (осаждение белка), изопропанол (осаждения ДНК) и 70% этанол для отмывки ДНК.

*Анализ гиперметилирования.* Анализ гиперметилирования с использованием ПЦР, чувствительной к метилированной ДНК, предусматривает этап модификации ДНК бисульфитным методом. В нашей работе образцы ДНК модифицировали с использованием набора для бисульфитной модификации CpGenome™ Universal DNA Modification Kit (Chemicon) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для анализа фактов гиперметилирования применялись две пары праймеров: для выявления неметилированной ДНК и для определения метилированной последовательности. Каждая пара праймеров использовалась в соответствующей независимой ПЦР. Выбранные для исследования праймеры представлены в таблице 1. В случае анализа гена RASSF1A исполь-

зовались три пары праймеров для проведения nested-PCR. На первом этапе анализа использовалась пара PAN-F и PAN-R, а затем ампликоны служили в качестве ДНК-мишени для проведения последующего анализа.

Состав реакционной смеси для проведения специфической к метилированию ПЦР в нашей работе был следующим: 2,5 мкл 10x Hot Start ПЦР буфер (200 mM Трис-НСl pH 8,3, 200 mM KCl, 50mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 1 мкл 10mM смеси dNTP, 0,1 мкл каждого 100 мкМ праймера, 2,0-2,5 мкл 25mM MgCl<sub>2</sub> (табл. 1), 0,1 мкл Hot Start Taq-полимеразы (5ед./мкл), 1 мкл образца модифицированной ДНК, вода ПЦР-качества до объема 25 мкл. Для ПЦР используются специальные пробирки объемом 0,2 мл.

Общая схема программы для амплификатора выглядит следующим образом: начальная денатурация – 4 мин. при 95°C, затем 35 циклов 30-секундной денатурации при 94°C, отжиг праймеров - 30 сек. при температуре 54-64°C (см. таблицу 1) и элонгация 30 сек. при 72°C. В завершении – финальная элонгация 5 мин. при 72°C и охлаждение до 4°C. Реакцию амплификации осуществляли в приборе GeneAmp 2400 PCR System (Perkin-Elmer).

Визуализация продуктов метилспецифической ПЦР осуществлялась посредством агарозного гель-электрофореза и окраской бромистым этидием в камере SE-2 (Helicon) с источником питания Эльф-4 (ДНК-технология). Гелевым и электродным буфером был 1x TBE раствор pH 8,0 с 0,05% бромистым этидием. Продукты амплификации объемом 7,5 мкл смешивали с 2,5 мкл загрузочного буфера (70% водный р-р глицерина и 0,05% бромфеноловый синий) и вносили в лунки 1,75% агарозного геля. Электрофорез проводили в течение 30 мин. при 200 В. Маркерами молекулярного веса являлись фрагменты ДНК из набора «GeneRuler 50bp DNA Ladder» (Fermentas), масса которых составляла 50-1000 пар нуклеотидов. Примеры электрофоретической детекции гиперметилирова-

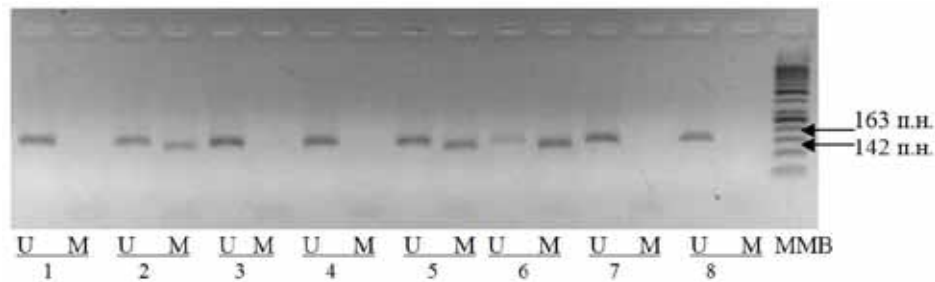
Таблица 1 – Праймеры для анализа гиперметилирования CpG-островков промоторных областей 9 исследуемых генов-супрессоров и оптимальные условия проведения ПЦР

Ген/ Локализация	Название праймера	Последовательность нуклеотидов 5'-3'	Параметры ПЦР	
			MgCl <sub>2</sub> , mM	T <sub>отж.</sub> , °C
RARβ 3p24	RAR-U-F	GGATTGGGATGTTGAGAATGT	2,0	60
	RAR-U-R	CAACCAATCCAACCAAAACAA		
	RAR-M-F	GAACGCGAGCGATTTCGAGT		
	RAR-M-R	GACCAATCCAACCGAAACG		
RASSF1A 3p21.3	PAN-F	GGAGGGAAGGAAGGGTAAG	2,5	54
	PAN-R	CAACTCAATAAACTCAAACCTCCC		
	MSP-F	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	2,5	64
	MSP-R	GCTAACAAACGCGAACCG		
	USP-F	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG	2,5	60
USP-R	CACTAACAAACACAAACCAAAC			
HIN1 1q23.1	HIN-U-F	GGTATGGGTTTTTTATGGTTTGT	2,0	60
	HIN-U-R	CAAAACTTCTTATACCCAATCCTCA		
	HIN-M-F	GGTACGGGTTTTTTACGGTTCGTC		
	HIN-M-R	AACTTCTTATACCCGATCCTCG		
DAPK 9q34.1	DAPUF	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	2,5	60
	DAPUR	CAAATCCCTCCCAAACACCAA		
	DAPMF	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC		
	DAPMR	CCCTCCCAAACGCCGA		
GSTP1 11q13-qter	MS-F	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	2,5	59
	MS-R	GCCCCAATACTAAATCACGACG		
	UMS-F	GATGTTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT		
	UMS-K	CCACCCCAATACTAAATCACAACA		
Cyclin D2 (CCND2) 12p13	D2UM-F	AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	2,5	56
	D2UM-R	ACATCCTCACCAACCCTCCA		
	D2M-F	GGCGGATTTTATCGTAGTCG		
	D2M-R	CTCCACGCTCGATCCTTCG		
hMLH1 3p22.3	H1UM-F	TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	2,5	56
	H1UM-R	ACCACCTCATCATAACTACCCACA		
	H1M-F	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC		
	H1M-R	CCTCATCGTAACTACCCGCG		
APC 5q21-q22	APCUM-F	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	2,5	61
	APCUM-R	CCAATCAACAAACTCCCAACAA		
	APCM-F	TATTGCGGAGTGCGGGTC		
	APCM-R	TCGACGAACTCCCGACGA		
p16 9p21	p16UM-F	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	2,5	59
	p16UM-R	CAACCCCAAACCACAACCATAA		
	p16M-F	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC		
	p16M-R	GACCCCGAACCGCGACCGTAA		

ния представлены на рисунках 1 и 2. Для более четкой визуализации использованы инвертированные изображения.

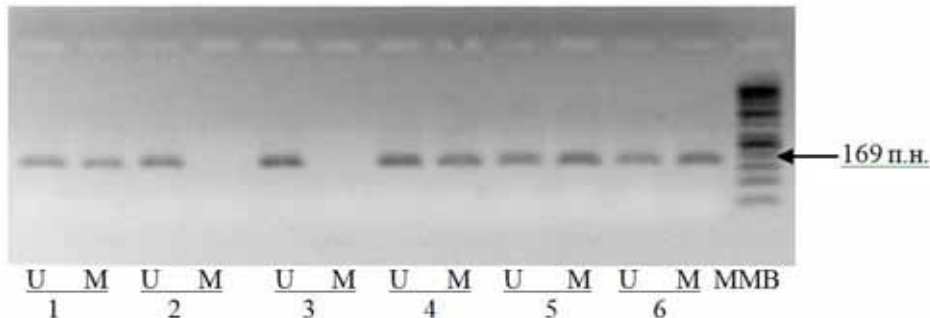
*Статистическая обработка результатов.* Статистическая обработка данных выполнялась с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для определения различий между группами по частоте

выявляемости качественных переменных использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса. Для выявления зависимости качественной бинарной переменной от количественной использовалась бинарная логистическая регрессия. Результаты анализа считались статистически значимыми при  $p < 0,05$  [12].



U – результат амплификации неметилированной ДНК, М – результат амплификации метилированной ДНК, ММВ – маркер молекулярного веса

**Рисунок 1** – Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену RARβ



U – результат амплификации неметилированной ДНК, М – результат амплификации метилированной ДНК, ММВ – маркер молекулярного веса

**Рисунок 2** – Результат электрофореза продуктов метилспецифической ПЦР по гену RASSF1A

### Результаты исследований

Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа 82 случаев РМЖ представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, среди 82 проанализированных образцов опухолевых тканей пациентов с РМЖ метилирование хотя бы по одному гену присутствует в подавляющем большинстве случаев (90,2%). Полностью метилирование отсутствовало лишь в 8 случаях. В тоже время, частота метилирования оказалась различной по каждому из 9 анализируемых генов. В таблице 2 также представлены итоговые значения частот фактов метилирования по 9 генам и оценка степени метилирования исследуемой группы в целом.

Наиболее метилированной среди 9 генов оказалась промоторная область RASSF1A – 76,8% случаев. Полученные в нашей работе данные по гену RASSF1A соответствуют результатам других исследований, указывающих на преобладающий характер гиперметилирования этого гена в опухолевой ткани РМЖ. Так, например, в работе Shukla с соавторами [9] отмечается, что RASSF1A был метилирован в 17 из 20 проанализированных образ-

цов опухолевых тканей РМЖ, что составляет 85%. В тоже время, в этой работе показано 10%-ное от всех случаев метилирование гена RARβ. В нашей работе данный ген был метилирован в 28,4% случаев.

Также частыми, по нашим данным, являются факты гиперметилирования при РМЖ таких генов, как HIN1, DAPK, APC и Cyclin D2. Единичные случаи метилирования выявлены для генов p16 и hMLH1. Более низкие значения метилирования по сравнению с имеющимися литературными данными были выявлены для гена GSTP1. В одной из работ сообщается о 31% метилировании промоторной области данного гена в опухолевой ткани первичных случаев РМЖ и 44% в клеточных линиях РМЖ [13].

Анализируя данные, представленные в таблице 2, необходимо отметить, что наиболее информативными с точки зрения оценки степени метилирования изучаемых генов в целом являются 5 генов из 9-ти – RASSF1A, Cyclin D2, APC, RARβ и DAPK. Этот факт позволяет рассматривать эти гены в качестве кандидатов для формирования высокочувствительной панели генетических маркеров для диагностики РМЖ на основе анализа ги-

Таблица 2 – Результаты анализа гиперметилирования промоторных областей 9 анализируемых генов-супрессоров в группе пациенток с РМЖ

№	ID	RARβ	HIN1	DAPK	RASSF1A	GSTP1	APC	CCND2	p16	hMLH1	В целом
1	Bt 351	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
2	Bt 352	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3	Bt 353	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
4	Bt 354	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
5	Bt 355	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
6	Bt 356	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
7	Bt 357	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
8	Bt 358	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Bt 359	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
10	Bt 360	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
11	Bt 361	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
12	Bt 363	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
13	Bt 364	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
14	Bt 365	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
15	Bt 366	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
16	Bt 367	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
17	Bt 368	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
18	Bt 369	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
19	Bt 370	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
20	Bt 371	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
21	Bt 372	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
22	Bt 373	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
23	Bt 374	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
24	Bt 375	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
25	Bt 376	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
26	Bt 377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Bt 378	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
28	Bt 379	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Bt 380	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Bt 381	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
31	Bt 382	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Bt 383	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
33	Bt 384	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
34	Bt 385	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
35	Bt 386	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
36	Bt 387	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
37	Bt 388	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
38	Bt 389	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
39	Bt 390	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
40	Bt 391	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
41	Bt 392	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
42	Bt 393	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Bt 394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Bt 395	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
45	Bt 396	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
46	Bt 397	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
47	Bt 398	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
48	Bt 399	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
49	Bt 400	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
50	Bt 401	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
51	Bt 402	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
52	Bt 403	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+

53	Bt 404	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
54	Bt 405	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+
55	Bt 406	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
56	Bt 407	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
57	Bt 408	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
58	Bt 409	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
59	Bt 410	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-
60	Bt 411	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
61	Bt 412	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
62	Bt 413	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
63	Bt 414	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
64	Bt 415	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
65	Bt 416	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
66	Bt 417	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
67	Bt 418	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
68	Bt 419	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
69	Bt 420	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
70	Bt 421	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
71	Bt 422	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
72	Bt 423	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
73	Bt 424	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
74	Bt 425	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
75	Bt 426	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
76	Bt 427	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
77	Bt 428	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
78	Bt 429	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
79	Bt 430	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
80	Bt 431	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
81	Bt 432	x	+	-	+	-	-	+	-	+	+
82	Bt 433	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Положит.		23	42	17	63	14	36	41	2	6	74
Всего		81	82	82	82	82	81	81	82	81	82
%		28,4	51,2	20,7	76,8	17,1	44,4	50,6	2,4	7,4	90,2

Примечание: + (серый блок) – положительный тест метилспецифической ПЦР с праймерами для метилированной ДНК, - (белый блок) – отрицательный тест метилспецифической ПЦР с праймерами для метилированной ДНК, x – отрицательный тест метилспецифической ПЦР с праймерами для метилированной и неметилированной ДНК

перметилирования. Однако эти данные являются предварительными и требуют дальнейшего исследования с увеличением числа исследованных случаев РМЖ и расширением спектра изучаемых генов-супрессоров. Также остается открытым вопрос о специфичности теста с использованием исследуемых генов, что требует дальнейших исследований по изучению степени их гиперметилирования в доброкачественных опухолевых патологиях молочной железы.

В нашем исследовании мы провели анализ сопряженности фактов гиперметилирования с различными клинкоморфологическими характеристиками изучаемых случаев РМЖ.

Проведенный анализ не выявил связи гиперметилирования с возрастом на момент выявления опухоли для всех исследованных генов.

Данные о клинкоморфологических характеристиках опухолей молочной железы проанализированы с учетом статуса гиперметилирования промоторной области каждого из девяти генов. При анализе использовались категории признаков по TNM-классификации, степень злокачественности G, стадия, гистологический тип опухолей и их рецепторный статус.

Статистически значимые различия между группами в зависимости от размера опухоли (категория T по TNM-

классификации) по частоте встречаемости гиперметилирования выявлены только для гена HIN1 ( $p=0,028$ ). В попарных сравнениях установлено, что различия по количеству случаев гиперметилирования значимы между подгруппами с T1 и T2 (частоты 19/26, 73% и 22/51, 43% соответственно,  $p=0,025$ ). В связи с небольшим количеством пациенток с размером опухоли соответствующим T3 и T4, выполнено сравнение частот при их объединении в одну группу T2-T4. В этом случае, в группе пациенток с меньшим размером опухоли (T1) значимо чаще наблюдалось гиперметилирование гена HIN1 (частота 19/26, 73%) по сравнению с объединенной группой T2-T4 (23/56, 41%,  $p=0,014$ ).

Значимых различий в частоте гиперметилирования ни по одному из генов в зависимости от наличия метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (категория N) и наличия отдаленных метастазов (категория M) установлено не было.

При проведении сравнительного анализа в зависимости от степени злокачественности при G2 значимо чаще наблюдалось гиперметилирование трех генов: RARb, HIN1 и APC ( $p=0,048$ ,  $p=0,0004$  и  $p=0,026$  соответственно) по сравнению с менее дифференцированными опухолями (G2).

Также был проведен анализ частоты случаев гиперметилирования в группах с различными стадиями опухолевого процесса. Среди опухолей с I стадией значимо чаще выявлялось гиперметилирование гена HIN1, по сравнению со II стадией, а также с группой, полученной после объединения II и III стадий. Относительные частоты составили 0,78/0,43 и 0,78/0,43,  $p=0,023$  и  $p=0,019$  соответственно. Анализ частот встречаемости по другим генам значимых различий не выявил.

Также значимые различия определялись по частоте гиперметилирования генов HIN1, DAPK, RASSF1A и APC в группах с различными гистологическими типами опухоли. Уровень значимости для критерия  $\chi^2$  составили  $p<0,001$ ,  $p=0,037$ ,  $p=0,011$

и  $p=0,005$  соответственно. В результате попарных сравнений определено, что гиперметилирование промоторной области гена HIN1 встречалось значимо чаще в случае протоково-дольковых и дольковых гистологических форм опухоли по сравнению с протоковыми формами рака (относительные частоты 0,86, 0,94 и 0,31 соответственно,  $p=0,019$  и  $p<0,001$ ).

В случае гена DAPK, значимо чаще гиперметилирование обнаруживалось лишь в дольковых формах, по сравнению с протоковыми (относительные частоты 0,47 и 0,13 соответственно,  $p=0,008$ ). Сходная зависимость была выявлена и для гена RASSF1A (относительные частоты 0,94 и 0,65,  $p=0,043$ ).

Для гена APC, по аналогии с геном HIN1, гиперметилирование чаще встречалось в протоково-дольковых и дольковых типах опухолей по сравнению с протоковыми (относительные частоты 0,86, 0,65 и 0,3,  $p=0,015$  и  $p=0,015$ ).

Различная частота гиперметилирования в зависимости от рецепторного статуса опухоли была обнаружена для генов HIN1 и CCND2. Гиперметилирование промоторной области гена HIN1 чаще встречалось в позитивных по рецепторам эстрогена и прогестерона опухолях (относительные частоты 0,26/0,68 и 0,39/0,68,  $p=0,005$  и  $p=0,031$  соответственно). В случае гена CCND2 относительная частота гиперметилирования в опухолях с определяемыми рецепторами прогестерона была выше, чем в опухолях с отсутствием последних (0,75/0,33,  $p=0,001$ ).

### Заключение

В ходе исследования проведен анализ гиперметилирования промоторных областей 9 генов-супрессоров в образцах опухолевой ткани 82 случаев РМЖ. В результате анализа установлено, что гиперметилирование хотя бы по одному гену присутствует в 90,2% случаев РМЖ. Наиболее информативными оказались 5 из 9 анализируемых генов - RASSF1A, Cyclin D2, APC, RAR $\beta$  и DAPK, что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для формирования диагности-

ческой панели маркеров. По ряду генов выявлена значимая связь частот гиперметилирования с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ.

Работа выполнена в рамках Государственной комплексной программы научных исследований «Современные клеточные молекулярно-генетические технологии в медицине; новые подходы к регуляции, коррекции (реабилитации) и профилактике патологических состояний человека» (договор №17/09-ФИ).

#### Библиографический список

1. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. / Baylin [et al.] // *Adv. Cancer Res.* - 1998. - Vol. 72. - P. 141-196.
2. Herman, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. / J. G. Herman // *Sem. Cancer Biol.* - 1999. - Vol. 9. - P. 359-367.
3. Метилирование ДНК и канцерогенез. / Лихтенштейн [et al.] // *Биохимия.* - 2001. - № 66. - С. 235-255.
4. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer / Yegnasubramanian [et al.] // *Cancer Research.* - 2004. - Vol. 64. - P. 1975-1986.
5. Detection of Aberrant p16 Methylation in the Plasma and Serum of Liver Cancer Patients/ Wong [et al.]// *Cancer Research.* - 1999. - Vol. 59. - P. 71-73.
6. Detection of Aberrant Promoter Hy-

permethylation of Tumor Suppressor Genes in Serum DNA from Non-Small Cell Lung Cancer Patients / Esteller [et al.] // *Cancer Research.* - 1999. - Vol. 59. - P. 67-70.

7. Detection of Bladder Cancer in Urine by a Tumor Suppressor Gene Hypermethylation Panel/ Dulaimi [et al.] // *Clinical Cancer Research.* - 2004. - Vol. 10. - P. 1887-1893.

8. Xing, M. BRAF mutation in thyroid cancer / M. Xing // *Endocrine-Related Cancer.* - 2005. - Vol. 12. - P. 245-262.

9. Detection of RASSF1A and RAR $\beta$  Hypermethylation in Serum DNA from Breast Cancer Patients/ S. Shukla [et al.]// *Epigenetics.* - 2006. - Vol. 1:2. - P. 88-93.

10. DNA methylation of RASSF1A, HIN1, RAR- $\beta$ , Cyclin D2 and TWIST in *in situ* and invasive lobular breast carcinoma / M. Fackler [et al.] // *Int. J. Cancer.* - 2003. - № 107. - P. 970-975.

11. Detection of Breast Cancer in Nipple Aspirate Fluid by CpG Island Hypermethylation / R. Krassenstein [et al.]// *Clinical Cancer Research.* - 2004. - Vol. 10. - P. 28-32.

12. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. - 3-е издание. - М.: Медиасфера, 2006. - 312 с.

13. Inactivation of Glutathione S-Transferase PI Gene by Promoter Hypermethylation in Human Neoplasia / M. Esteller [et al.] // *Cancer research.* - 1998. - №. 58. - P. 4515-4518.

**A. Silin, V. Martinkov, E. Nadyrov, S. Martynenko, D. Rodjko**

#### **FREQUENCIES OF HYPERMETHYLATION OF PROMOTER AREAS OF GENES-SUPPRESSORS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER**

In the article there are the results of molecular-genetic analysis of hypermethylation of promoter areas of 9 genes-suppressors: RASSF1A, HIN1, DAPK, APC, Cyclin D2, RAR $\beta$ , GSTP1, p16 and hMLH1 in the group of 82 patients with a diagnosis of breast cancer. It was shown that hypermethylation by at least one gene is available in 90,2% of breast cancer cases. The most informative were found to be 5 out of 9 analyzed genes: RASSF1A, Cyclin D2, APC, RAR $\beta$ , and DAPK that help to consider them as candidates for forming of diagnostic marker panel. By the number of genes there was determined the significant association of frequencies of hypermethylation with clinical-morphological characteristics of breast cancer.

**Key words:** *breast cancer, hypermethylation of genes-suppressors, polymerase chain reaction*

*Поступила 01.04.10*