

УДК 616.19+618.11]-006.04-031.14:575.113

Т.П. Казубская¹, Д.С. Ходырев², И.В. Процина², В.Д. Ермилова¹, Ю.Г. Паяниди¹, Н.В. Чхиквадзе¹,
В.Ю. Сельчук¹, Э.А. Брага², В.И. Логинов²

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ-СУПРЕССОРОВ
В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ,
ВКЛЮЧАЯ ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫЕ**

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

²Государственный Научный Центр РФ ГосНИИ генетика, Москва

Контактная информация

Казубская Татьяна Павловна, д-р мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24, тел. +7(499)324-26-85

E-mail: kazubskaya@yahoo.com

Статья поступила: 29.02.2012, принята к печати 29.02.2012.

Резюме

В рамках исследования впервые проведено комплексное изучение статуса метилирования генов-супрессоров *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* в образцах ткани опухолей молочной железы и яичников, а также прилежащей к ним гистологически нормальной ткани. Впервые установлено, что аномальное метилирование промоторной области гена *RASSF1A* выявляется на доклинической стадии развития рака молочной железы и яичников, что позволит в перспективе использовать этот метод в клинической практике в качестве ранней неинвазивной диагностической методики.

Ключевые слова: рак молочной железы и яичников, первично-множественных рак, метилирование, гены *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B*.

T.P. Kazubskaya¹, I.V. Khodyrev², I.V. Pronina², V.D. Ermilova¹, J.G. Payanidi¹, N.V. Chkhikvadze¹,
V.I. Celchuk¹, E.A. Braga², V.I. Loginov²

**TUMOR SUPPRESSOR GENES METHYLATION
IN BREAST AND OVARIAN CARCINOMA,
INCLUDING MULTIPLE PRIMARY TUMORS**

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

²Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics, Moscow

Abstract

The research conducted the first comprehensive study of the methylation status of tumor suppressor genes *RASSF1A*, *RARβ2* and *SEMA3B* in breast and ovarian carcinoma tissue samples, as well as in adjacent histologically normal tissue. For the first time it was found out that abnormal methylation of *RASSF1A* gene promoter region could be detected at the preclinical stage of breast and ovarian cancer, that would help to use this method in clinical practice as a noninvasive technique for early diagnosis.

Key words: breast and ovarian cancer, multiple primary cancers, methylation, *RASSF1A*, *RARβ2* and *SEMA3B* genes.

Введение

Урбанизация и старение населения, ухудшение общей экологической ситуации, техногенные катастрофы приводят к наблюдаемому за последнее десятилетие, неуклонному росту онкологических заболеваний, включая ПМЗО [5; 7].

Под первичной множественностью опухолей в настоящее время понимают независимое возникновение и развитие у одного больного двух или более новообразований. При этом пораженными могут быть не только разные органы различных систем, но и парные органы (молочные железы, легкие и другие). В России показатель заболеваемости ПМЗО на 2005 г. составил 8,3, а на 2010 г. – 11,2 на 100 000 населения, при этом, доля синхронных опухолей из них, составила 33 % [6].

По имеющимся наблюдениям, ПМЗО могут быть одним из проявлений различных наследственных синдромов, которые являются результатом специфических наследственных мутаций, определяющих риск развития рака у 50% потомков, с поражением органов ассоциированных с этими

синдромами [3]. Поэтому риск развития полинеоплазии выше для лиц из наследственно отягощенных семей. Самой частой разновидностью семейных опухолевых заболеваний у женщин является наследственный рак молочной железы (РМЖ). Его вклад в общую встречаемость РМЖ составляет примерно 5 – 10 % [2]. Классически разновидности наследственного РМЖ ассоциированы также с высоким риском развития рака яичников (РЯ), поэтому в литературе обычно используется термин «синдром РМЖ/РЯ» (breast-ovarian cancer syndrome). Доля наследственного РМЖ/РЯ в общей заболеваемости неоплазиями яичников ещё более заметна. Считается, что как минимум 10 – 15 % случаев РЯ можно объяснить присутствием генетических факторов [10; 15]. Установлено, что приблизительно в 20 – 30 % развитие наследственных форм РМЖ/РЯ обусловлено наличием мутаций в генах *BRCA1* или *BRCA2*. Однако огромные усилия учёных направлены на идентификацию других генов, ответственных за развитие РМЖ и/или РЯ, которые позволили бы выявлять эти заболевания ещё на доклиническом уровне.

Как и многие злокачественные опухоли, РМЖ и РЯ имеют мультифакторную природу. В их патогенезе важную роль играют онкогены и гены опухолевой супрессии. В основе инактивации генов-супрессоров опухолей и селективного роста злокачественно измененных клеток лежат генетические и эпигенетические повреждения. Генетические изменения включают точковые мутации, делеции, перестройки, тогда как эпигенетические изменения (метилирование) влияют на временной и пространственный контроль экспрессии гена без изменения в последовательности ДНК. Механизмом эпигенетических изменений служит обратимое присоединение метильной группы к цитозину в CG-динуклеотидах (цитозин-гуанин-динуклеотидах), расположенных в регуляторных участках генов. Это явление получило название аномального метилирования генов в опухоли. Считается, что эпигенетические нарушения при малигнизации являются наиболее ранними и могут иметь место задолго до клинической манифестации заболевания [9]. К настоящему времени установлено, что метилирование генов ассоциировано с агрессивной формой опухоли и прогрессией заболевания [2; 14; 18].

Следовательно, определение степени метилирования генов-супрессоров опухолевого роста можно использовать в качестве маркера агрессивности опухолевого процесса для прогноза течения заболевания и для коррекции терапевтической стратегии при лечении РМЖ и РЯ.

Целью работы являлся комплексный анализ метилирования генов-супрессоров *RASSF1A*, *SEMA3B* и *RARβ2* и изучение роли этих генов в развитии рака молочной железы и яичников.

Материалы и методы

Парные образцы опухолевой и гистологически нормальной ткани взяты у пациенток, которые до операции не получали лучевой или химиотерапии. Выборка составила 56 образцов рака молочной железы и 50 эпителиальных опухолей яичников. Все случаи классифицировали по TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового союза (UICC, версия 1998 г.). Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток проводился гистологический анализ микросрезов (толщина 5 мкм) после их окрашивания эозином и гематоксилином, что позволяло получить в исследуемом материале не менее 70% опухолевых клеток. Образцы тканей хранили при -70°C . В качестве дополнительного контроля использовали по пять образцов тканей молочной железы и яичников, полученных от доноров без онкологических заболеваний в анамнезе. ДНК из ткани выделяли по стандартной методике [4]. Работа проведена на базе Государственного Научного Центра РФ ГосНИИ генетика.

Анализ метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* методом метилчувствительного рестриктазного анализа (МЧРА) с использованием набора ферментов выполнен по аналогии с методом, предложенным ранее [4]. Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований и оставлять не гидролизованными участки, содержащие 5-метилцитозин. В соответствии с рестриктной картой промоторных CpG-островков исследованных генов применяли от двух до четырех метилчувствительных рестриктаз, фирмы «Fermentas»: *HpaII* (CCGG) *HhaI* (GCGC), *SsiI* (CCGC), и *Bsh1236I*

(CGCG). Расщепление ДНК рестриктазами *HhaI* и *HpaII* проводили в буфере Y, *Bsh1236I* – в буфере R, *SsiI* – в буфере O, фирмы «Fermentas». В качестве матрицы для ПЦР использовали парные образцы ДНК опухолевой и условно нормальной ткани до и после обработки ферментом. В качестве контроля сохранности ДНК (K2) использовали продукт ПЦР фрагмента экзона 1 гена *RARβ2* (229 п.н.), т.к. этот фрагмент не содержит участков узнавания указанных рестриктаз. Полноту расщепления образцов ДНК ферментами проверяли с помощью амплификации фрагмента гена β -3А-адаптина (445 п.н.) (K1), который содержит неметилированные участки узнавания рестриктаз *HpaII*, *HhaI*, *SsiI* и *Bsh1236I* (как в норме, так и в опухоли).

Праймеры и условия ПЦР приведены в табл. 1. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-HCl, pH 9,3; 16,7 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% твин-20; 1,5–2,5 мМ MgCl_2 ; 0,25 мМ каждого dNTP; 25 пМ каждого праймера; 1 ед. Hot Start Taq ДНК полимеразы, фирмы «СибЭнзим»; 5–20 нг ДНК пробы. Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C – 2 мин; 35 циклов (93°C – 20 с, $T_{\text{отж}}$ – 30 с, 72°C – 20 с) и 72°C – 4 мин. ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (Россия). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле.

Статистический анализ проводился с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». При анализе достоверности полученных данных был использован точный критерий Фишера. Достоверность считалась значимой, если $p \leq 0,05$ [23].

Результаты и обсуждение

Важно отметить, что клиническая информация для всех анализируемых групп больных не была известна до окончания изучения, которое показало, что из 59 изученных образцов РМЖ 12 принадлежали пациенткам с ПМЗО, а из 50 образцов РЯ – 5 были с ПМЗО, одной из которых был РЯ.

Изучение метилирования ДНК в опухолях молочной железы и яичников проводилось с использованием МЧРА, что позволило не только более полно определить долю образцов, в которых эти гены метилированы, но и оценить плотность метилирования CpG островка в каждом образце.

Анализ метилирования промоторного района гена *RASSF1A* при РМЖ и РЯ

На рис. 1 приведены типичные примеры анализа метилирования промоторного района гена *RASSF1A* с помощью МЧРА при РМЖ и РЯ.

Согласно полученным данным частота метилирования гена *RASSF1A* в опухолях молочной железы и яичников достоверно выше, чем в гистологически нормальной ткани ($p \leq 0,05$) (табл. 2). Частота метилирования гена *RASSF1A* при РМЖ и РЯ составила 78 % (46/59) и 72 % (36/50) соответственно, что почти вдвое превышает литературные данные (40 %) [13]. Наблюдаемые различия в метилировании гена *RASSF1A* могут быть связаны главным образом с чувствительностью метода и с этнографическими особенностями исследуемых популяций. Различия в плотности метилирования CpG-пар, были менее выражены и, согласно данным МЧРА, достоверны только при раке молочной железы ($p = 1,0 \times 10^{-7}$) (см. табл. 2). В то же время метилирование промоторного района гена *RASSF1A* в ДНК, из тканей молочной железы и яичников, полученных от пяти без онкологических заболеваний в анамнезе доноров, выявлено не было.

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры и условия ПЦР, использованные при анализе метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *RAR-β2* и *SEMA3B* методом МЧРА

Маркер	Структура праймеров	T _{отж} /Mg, mM	Продукт ПЦР, п.н.
K1*	TGCCCTCTGGACTGGAACCT CCTGAGCCCAGCCCAAGTC	64 °C 1,5	445
K2**	AGAGTTTGATGGAGTTGGGT CATTCGGTTTGGGTCAATCC	62 °C 1,5	229
RASSF1A	GTAAAGCTGGCCTCCAGAAACACGG GCAGCTCAATGAGCTCAGGCTCCCC	65 °C 2,5	357
RARβ2	ATTTGAAGGTTAGCAGCCCG CATTCGGTTTGGGTCAATCC	56 °C 1,5	680
SEMA3B	TTGAGATATTGGAGTCCACGGGTG CAGTGTGGCCTGGAAGACCTC	56 °C 1,5	450

*K1 – контроль полноты гидролиза ДНК, фрагмент гена *β-3A-адантина* (ID Gen Bank AF247736.2.);

** K2 – контроль сохранности ДНК, фрагмент экзона 1 гена *RARβ2*

Таблица 2

Частота и плотность метилирования промоторного района гена *RASSF1A* при РМЖ и РЯ по данным МЧРА*

Вид рака	Частота метилирования**	Плотность метилирования***
<i>P=</i>	5.9×10^{-6}	1.0×10^{-7}
РМЖ	опухоль	46/59, 78%
	норма	21/59, 36%
<i>P=</i>	1.11×10^{-9}	0,1415
РЯ	опухоль	36/50, 72%
	норма	6/50, 12%

*Рассчитано на основании данных по 59 образцам РМЖ и 50 образцам РЯ.

**Частота метилирования – доля образцов, в которых выявлено метилирование.

***Плотность метилирования – доля метилированных CpG-пар локуса в группе исследованных образцов. За 100 % принято произведение числа CpG в локусе на число исследованных образцов, в которых выявлено метилирование.

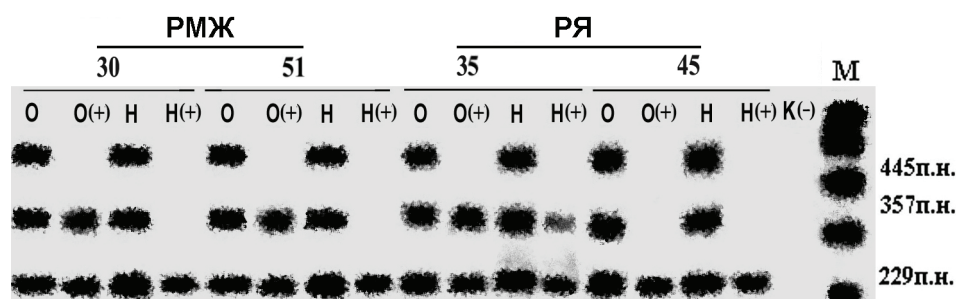


Рис. 1. Применение метода МЧРА для анализа метилирования промоторного района гена *RASSF1A*. Электрофоретическое разделение в 2%-ном агарозном геле продуктов ПЦР ДНК до и после (+) гидролиза рестриктазой *SsiI*. K(-) - отрицательный контроль (в отсутствие ДНК). М – маркер с шагом 100 п.н. (100 bp DNA ladder).

№ Образца	МЧРА						
	1	4	5	6	11	14	15
Опухоль	20						
	25						
	30						
	36						
	47						
Норма	20						
	25						
	30						
	36						
	47						

Рис. 2. Схематическое изображение метилирования промоторного района гена *RARβ2* в 5 образцах РЯ по данным МЧРА. Черный прямоугольник – метилирование выявлено, белый прямоугольник – метилирование не выявлено. Сверху позиции CpG-динуклеотидов; с левого края приведены номера образцов РЯ.

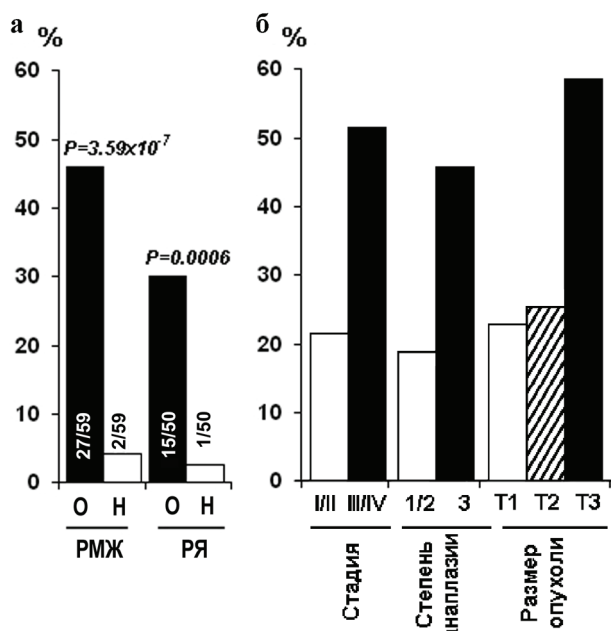


Рис. 3. Особенности гена *RARβ2* при первичных опухолях РМЖ и РЯ. Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера ($P \leq 0.05$).

А: частота метилирования промоторного CpG-островка (образцы ДНК первичных опухолей РМЖ и РЯ).

Б: связь частоты метилирования с прогрессией опухолей.

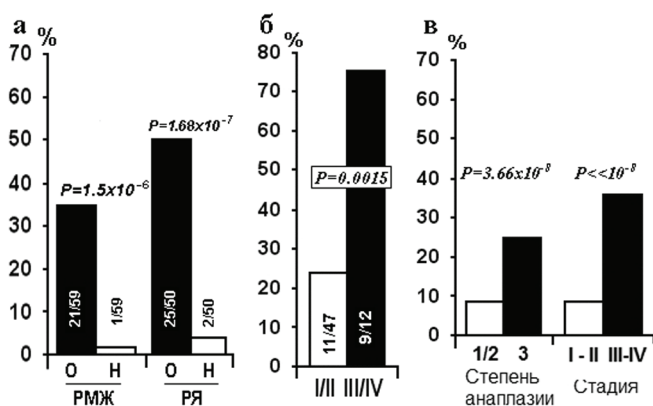


Рис. 4 Особенности гена *SEMA3B*. Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.

А: частота метилирования дистального промоторного CpG-островка (образцы ДНК первичных опухолей РМЖ и РЯ).

Б: корреляция частоты метилирования с клинической стадией при РМЖ.

В: корреляция плотности метилирования промоторного CpG-островка со степенью анаплазии и с клинической стадией при РМЖ.

Все это позволяет считать метилирование этого гена ранним событием в патогенезе РМЖ и РЯ и может быть использовано как молекулярный маркер злокачественной трансформации. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, указывающими на то, что эпигенетические изменения ДНК в промоторной области гена *RASSF1A* в опухоли возникают раньше, чем структурные изменения ДНК и морфологические изменения в ткани [1; 4; 8; 17].

В нашей работе, выполненной на представительной выборке (59 образцов РМЖ и 50 РЯ), не найдено статистически достоверной зависимости частоты метилирования промоторной области гена *RASSF1A* от стадии, степени анаплазии и метастазирования опухолей ($p=0.3-1.0$, данные не приведены). Отсутствие связи с прогрессией согласуется с заключением о том, что метилирование *RASSF1A* — одно из ранних событий в патогенезе РМЖ и РЯ.

Анализ метилирования промоторного района гена *RARβ2* при РМЖ и РЯ

Методом МЧРА с использованием 3-х метилчувствительных рестриктаз *HpaII*, *SsiI* и *Bsh1236I* суммарно тестировали 7 CpG-динуклеотидов (1, 4, 5, 6, 11, 14 и 15, рис. 2). Из них 3 CpG пары исследованы *HpaII* (1, 11 и 15), 4 и 14 — *SsiI* и 5 и 6 — *Bsh1236I*.

В качестве примера на рис. 2 приведены результаты анализа метилирования 5 парных образцов ДНК РЯ.

Проведенный нами анализ показал (рис. 3, А), что частота метилирования промоторного района гена *RARβ2* составляет 46 % (27/59) при РМЖ и 30 % (15/50) при РЯ, и статистически достоверно отличается от таковой в гистологически нормальной ткани ($p < 0.05$).

У пациенток с ПМЗО метилирование этого гена выявлено в 67 % (8/12) образцов с поражением молочной железы и у 80 % (4/5) — с поражением яичника. Наличие метилирования промоторной области гена *RARβ2* в некоторых образцах ДНК гистологически нормальной ткани молочной железы и яичников пациентов, выявляемое с частотой 2–4 % означает, что эта модификация может происходить в начале онкогенеза, предшествуя структурным изменениям в ДНК тканей пациентов. В то же время метилирование промоторного района гена *RARβ2* в дополнительном контроле обнаружено не было. Нами также была показана связь частоты изменения метилирования промоторного района гена *RARβ2* со стадией, степенью анаплазии и размером опухоли при РМЖ ($p \leq 0.05$) (рис. 3, Б). Другими авторами метилирование промоторной области данного гена было обнаружено в предраковых образованиях, а частота метилирования возрастала с образованием злокачественных опухолей и с прогрессией заболевания [12; 16].

Анализ метилирования промоторного района гена *SEMA3B* при РМЖ и РЯ

Методом МЧРА с использованием 2-х метилчувствительных рестриктаз *HpaII* и *SsiI* было проанализировано 59 парных образцов РМЖ и 50 РЯ. Проведенный анализ показал, что метилирование гена *SEMA3B* выявляется в 36 % случаев РМЖ (21/59) и в 50 % образцах РЯ (25/50) (рис. 4, А). Кроме того, обнаружено, что промоторная область гена *SEMA3B* достоверно чаще метилирована в ДНК опухоли, чем в ДНК соответствующей гистологически нормальной ткани той же пациентки ($p \leq 0,05$) и не было обнаружено в дополнительном контроле.

У пациенток с первичномножественным раком частота метилирования гена *SEMA3B* в 33 % (4/12) образцов с РМЖ и в 60 % (3/5) образцов с РЯ. Кроме того, показано, что промоторная область гена *SEMA3B* достоверно чаще метилирована в ДНК опухоли, чем в ДНК гистологически нормальной ткани молочной железы или яичников ($p \leq 0,05$ по Фишеру) (рис. 4, А). В то же время, метилирование промоторного района гена *SEMA3B* в дополнительном контроле выявлено не было. Эти данные указывают на функциональное значение и специфичность метилирования промоторной области этого гена в онкогенезе изучаемых опухолей. Выявлена достоверная корреляция частоты метилирования промоторного района гена *SEMA3B* с клинической стадией при РМЖ ($p < 0,05$) (рис. 4, Б). Нами рассчитана плотность метилирования CpG-островка гена *SEMA3B* (сумма метилированных CpG относительно суммы исследованных CpG в 21 образце ДНК первичных опухолей РМЖ и 25 образцах РЯ, в которых выявлено метилирование). Показана достоверная корреляция плотности метилирования со степенью злокачественности и стадией при РМЖ ($p < 10^{-6}$ по Фишеру; рис. 4, В).

Данные по метилированию гена *SEMA3B* ранее были получены только для немелкоклеточного рака легкого, раке печени и желчного пузыря и нейробластомы. [19; 20; 21; 22].

Высокая частота метилирования в образцах ДНК опухолей и феномен выявления метилирования в нормальной ткани у пациентов с РМЖ и РЯ (еще до возникновения морфологических изменений) может указывать на связь метилирования гена *SEMA3B* с началом онкогенеза, что важно для использования этого теста в качестве маркера при комплексной диагностике рака.

Литература

1. Брага Э.А., Киселев Л.Л., Забаровский Е.Р. От идентификации геномных полиморфизмов к диагностическим и прогностическим маркерам эпителиальных опухолей человека // Молекулярная Биология. – 2004. – 38. – С. 179–90.
2. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты. – Санкт-Петербург, 2007. – 211 с.
3. Казубская Т.П., Белев Н.Ф., Нефедов М.Д. и др. Клинико-генетический анализ первично множественных злокачественных новообразований // Российский онкологический журнал. – 2007. – № 2. – С. 4–9.
4. Логинов В.И., Маликова А.В., Серегин Ю.А. и др. Уровень метилирования гена *RASSF1A* в эпителиальных опухолях почки, молочной железы и яичников // Молекулярная биология. – 2004. – № 38. – С. 654–67.
5. Попова Т.Н., Федоров В.Э., Харитонов Б.С. Первично-множественные синхронные злокачественные новообразования пищеварительной системы // Медицинский альманах. – 2011. – № 5. – С. 76–9.
6. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2010 г. под ред. М.И. Давыдова, Е.М. Аксель // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2011. – Т. 19 (прил. 1).
7. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. – 260 с.
8. Angeloni D. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease // Brief. Funct. Genomic Proteomic. – 2007. – 6(1). – P. 19–39.

Анализ метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* в ПМЗО с РМЖ и/или РЯ

Нами впервые показана значимо более высокая частота метилирования гена *RASSF1A* при ПМЗО в сравнении с солитарными опухолями. Так, частота метилирования промоторной области гена *RASSF1A* в ПМЗО при РМЖ составила 90 % (11/12). Причем у 6 пациенток, наблюдался билатеральный РМЖ, а у других 5 – одной из первых опухолей был РМЖ. Метилирование гена *RASSF1A* также выявлено в 90 % (4/5) среди больных с ПМЗО, у которых одной из первых опухолей был рак яичников. Для всех пациенток с ПМЗО метилирование гена *RASSF1A* была найдено и в гистологически нормальной ткани. Метилирование гена *RARβ2* выявлено в 67 % (8/12) образцов с поражением молочной железы и у 80 % (4/5) – с поражением яичника. У пациенток с первично-множественным раком частота метилирования гена *SEMA3B* обнаружена в 33 % (4/12) образцов с РМЖ и в 60 % (3/5) образцов с РЯ. Таким образом, показано повышение частоты метилирования в ПМЗО и с РМЖ, и с РЯ у всех 3 исследованных генов супрессоров по сравнению с данными, представленными в табл. 2 и на рис. 3, А и 4, А. Причем частота метилирования гена *RARβ2* при ПМЗО с РЯ была достоверно выше ($p = 0,0434$), чем при обычном РЯ. В литературе высокая частота метилирования при первичномножественном раке также была выявлена при изучении плоскоклеточного рака полости рта [11].

Заключение

Изучение статуса метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* показало, что эпигенетическое изменение промоторных областей этих генов может быть одним из последовательных молекулярных изменений при РМЖ и РЯ, а метилирование *RASSF1A* и *RARβ2* коррелирует с тенденцией к развитию ПМЗО в молочной железе и яичниках. Возможно, метилирование ДНК является одной из причин возникновения ПМЗО у пациенток с РМЖ и РЯ. Выявленные особенности эпигенетических изменений генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *SEMA3B* могут быть использованы, как с целью ранней диагностики РМЖ (*RASSF1A*), так и в качестве новых прогностических тестов (*SEMA3B* и *RARβ2*), и позволят выделить группы риска больных по развитию РМЖ и РЯ, как солитарных, так и ПМЗО.

9. *Belinsky S.A., Nikula K.J., Palmisano W.A. et al.* Aberrant methylation of p16 (INK4a) is an early event in lung cancer and potential biomarker for early diagnosis // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – 95(20). – P. 11891–6.
10. *Capen CC.* Mechanisms of hormone-mediated carcinogenesis of the ovary // *Toxicol Pathol*. – 2004. – 32(Suppl 2). – P. 1–5.
11. *Czerninski R., Krichevsky S., Ashhab Y. et al.* Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, *hMLH1* and *hMSH2* in oral squamous cell carcinoma // *Oral Diseases Oral Dis*. – 2009. – 15(3). – P. 206–13.
12. *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). – P. 1–13.
13. *Dammann R., Schagdarsurengin U., Seidel C. et al.* The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update // *Histol Histopathol*. – 2005. – 20(2). – P. 645–66.
14. *Dammann R., Li C., Yoon J.H. et al.* Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3 // *Nat Genet* 2000. – 25. – P. 315–9.
15. *Gadducci A., Cosio S., Gargini A., Genazzani A.R.* Review Sex-steroid hormones, gonadotropin and ovarian carcinogenesis: a review of epidemiological and experimental data. Review// *Gynecol Endocrinol*. – 2004. – 4. – P. 216–28.
16. *Jing F., Yuping W., Yong C. et al.* CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma // *Tumour Biol*. – 2010. – 4. – P. 321–31.
17. *Kuroki T., Trapasso F., Yendamuri S. et al.* Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of Semaphorin 3B in non-small cell lung cancer // *Cancer Res*. – 2003. – 63. – P. 3352–5.
18. *Lerman M.I., Minna J.D.* The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium // *Cancer Res*. – 2000. – 60(21). – P. 6116–33.
19. *Marsit C.J., Houseman E.A., Christensen B.C. et al.* Examination of a CpG island methylator phenotype and implications of methylation profiles in solid tumors // *Cancer Res*. – 2006. – 66(21). – P. 10621–29.
20. *Nair P.N., McArdle L., Cornell J. et al.* High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene // *Cancer Genet. Cytogenet*. – 2007. – 174. – P. 100–10.
21. *Riquelme E., Tang M., Baez S. et al.* Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma // *Cancer Lett*. – 2007. – 250. – P. 100–6.
22. *Tischhoff I., Markwarth A., Witzigmann H. et al.* Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors // *Int. J. Cancer*. – 2005. – 115. – P. 684–9.
23. *Weir B.S.* Mathematical analysis of DNA sequences // *Genome*. – 1989. – 31(2). – P. 1093–4.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

