

©Коллектив авторов

ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ ЛЮМИНАЛЬНЫМ HER2-НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ В РЕГИОНАРНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ

А.М. Красный*, С.В. Куревлев, А.А. Садекова, Т.Г. Сефиханов, В.В. Кометова, В.В. Родионов

Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова,
117997, Москва, ул. Академика Опарина, 4; *эл. почта: alexred@list.ru

Аберрантное метилирование генов сопровождается развитием злокачественных новообразований, однако достаточных данных по связи метилирования и метастазирования в регионарные лимфатические узлы (РЛУ) до сих пор нет. Целью данной работы было изучение уровня метилирования в первичной опухоли аберрантно метилированных генов *WIFI*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* для прогнозирования метастазирования в лимфатические узлы у больных раком молочной железы (РМЖ). Для оценки уровня метилирования был использован метод MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melting). В исследование вошли 66 пациенток с люминальным А (LumA) и 46 пациенток с люминальным В HER2-негативным (LumB-) подтипом РМЖ, из которых 22 и 26 соответственно имели метастазы в РЛУ. Было установлено, что уровень метилирования между подтипами LumA и LumB- имел статистически значимое различие в трёх генах: *WIFI* ($p<0,001$), *CDO1* ($p=0,002$) и *MEST* ($p=0,033$), что указывало на необходимость рассмотрения каждого подтипа по отдельности. В подтипе LumA были обнаружены статистически значимые различия по уровню метилирования гена *WIFI* в первичной опухоли между пациентками, имеющими метастазы в РЛУ и пациентками без метастазов ($p=0,03$). У пациенток с подтипом LumA и размером опухоли более 2 см наблюдалось увеличение статистической значимости различий между группами при оценке уровня метилирования гена *WIFI* — $p=0,009$ ($AUC(95\%CI)=0,76$ (0,59–0,93)). У пациенток с подтипом LumB- три гена *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* имели статистически значимые различия по уровню метилирования между группами ($p=0,03$; $p=0,048$ и $p=0,045$ соответственно). ROC-анализ показал, что при сочетании трёх генов методом логистической регрессии $AUC(95\%CI)$ составила 0,74 (0,6–0,88). При анализе опухолей размером больше 2 см статистическая значимость различий между группами для указанных генов не увеличилась ($p=0,046$; $p=0,089$ и $p=0,076$ соответственно). Таким образом, исследование метилирования в первичных опухолях может быть перспективным для прогнозирования метастазирования в регионарные лимфатические узлы и лучшего понимания биологии рака молочной железы.

Ключевые слова: метилирование; первичная опухоль; рак молочной железы; метастазы в лимфатические узлы; LumA; LumB

DOI: 10.18097/PBMC20216701088

ВВЕДЕНИЕ

Выявление метастазов в регионарных лимфатических узлах (РЛУ) у больных раком молочной железы (РМЖ) имеет как практический, так и теоретический интерес. В настоящее время произошло существенное уменьшение объёма аксиллярной хирургии от лимфодиссекции к биопсии сигнального лимфоузла [1-4]. Биопсия сигнального лимфатического узла (БСЛУ) позволила значительно снизить (но не исключить полностью) количество нежелательных явлений, вызванных лимфодиссекцией: их частота после БСЛУ достигает 15% [5, 6]. Неслучайно, в последние годы активно обсуждаются вопросы полного отказа от хирургического вмешательства в регионарные РЛУ [7]. Таким образом, становится очевидной необходимость поиска новых предикторов метастатического поражения РЛУ, в первую очередь, основываясь на характеристиках первичной опухоли. Для метастазирования важную роль играют такие факторы как формирование внутриопухолевых лимфатических сосудов, образование преме́тастатической ниши в лимфатических узлах, создание системной иммунной

толерантности, которая включает перекрёстную презентацию опухолевого антигена толерогенными антиген-презентирующими клетками, апоптоз антиген-презентирующих клеток и подавление противоопухолевых Т-клеток расширенным пулом Tregs [8]. Данные процессы зависят от молекулярных особенностей первичной опухоли. Также известно, что наблюдается нелинейная корреляция между увеличением размера опухоли и частотой метастазирования в РЛУ при РМЖ [9]. Первичные опухоли размером менее 2 см имеют низкий метастатический потенциал. Опухоли размером 2-5 см и более 5 см имеют высокую и очень высокую вероятность метастатического поражения РЛУ [10-11]. В представленной работе мы исследовали возможную связь метилирования в первичной опухоли и процесса метастазирования в РЛУ при РМЖ. Ранее проведённые исследования показали, что профиль метилирования в первичной опухоли может быть связан с метастазированием в РЛУ [12]. Так, Shinozaki и соавт. отмечали увеличение метилирования гена *RARB2* в первичной опухоли при метастазировании [13]. Однако особенностей метилирования генов в первичной опухоли,

которые можно использовать для прогнозирования метастазирования в РЛУ, до сих пор обнаружено не было. В данной работе была исследована связь между aberrантно метилированными генами *WIFI*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* при РМЖ и метастазированием в РЛУ. Белковые продукты генов *RASSF1A* и *CDO1* являются опухолевыми супрессорами. О функциях гена *RASSF1A* известно, что он может блокировать экспрессию циклина D1 и таким образом вызывать остановку клеточного цикла [14]. *CDO1* (Cysteine Dioxygenase 1) — жизненно важный фермент, участвующий в биодеградации токсичного цистеина и тем самым регулирующий концентрацию цистеина в организме; *CDO1* является геном-супрессором опухолей при различных онкологических заболеваниях [15]. *MEST* (Mesoderm-specific transcript) представляет собой продукт импринтированного гена *MEST*, возможной функцией которого является блокирование клеточной дифференцировки [16].

Целью работы было изучить возможность использования уровня метилирования в первичной опухоли при РМЖ генов *WIFI*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* для прогнозирования метастазирования в РЛУ.

МЕТОДИКА

В исследование были включены 112 пациенток, которые проходили оперативное лечение опухоли молочной железы в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова. Критерием включения в исследование являлось наличие опухоли подтипа LumA или LumB-. Во всех случаях рак молочной железы был верифицирован морфологически. Все биоптаты опухолевой ткани были получены в ходе оперативного лечения. Полученный в ходе операции биологический материал доставлялся в патолого-анатомическое отделение в нефиксированном виде. Дальнейшая обработка производилась в максимально короткие сроки: время от момента получения материала до момента его фиксации не превышало 30-40 мин.

Патологоанатомом производился разрез опухолевого узла, оценивался размер опухоли в миллиметрах (длина). Далее производилась вырезка фрагментов опухолевой ткани узла размером 5×5×5 мм в количестве 2 штук, которые помещались в криобирки объемом 2 мл со средой для стабилизации (РНК-later). Полученный материал доставлялся в лабораторию по сбору и хранению биоматериала для хранения до востребования.

Для оценки относительного уровня метилирования в данной работе предложен оптимизированный метод MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melting), который имеет ряд особенностей, по сравнению с предложенным Wojdacz и соавт. [17].

1. Был изучен длинный фрагмент CpG-островков размером 400-500 пар нуклеотидов (п.н.), что позволило более объективно сравнивать общий уровень метилирования исследуемых CpG-островков, по сравнению с короткими фрагментами.

2. Интеркалирующий краситель EVAGreen добавляли после наработки продукта (во избежание ингибирования ПЦР).

3. Для повышения эффективности амплификации длинных фрагментов ПЦР проводили в два этапа: сначала продукт нарабатывался при отжиге праймеров близкой к температуре плавления праймеров; на втором этапе был использован отжиг при температуре 50°C. В одноэтапном протоколе нужно количество ДНК для оценки кривых плавления не нарабатывалось.

4. Мы отказались от использования стандартов с различным уровнем метилирования при оценке результатов HRM, так как был значительный разброс по уровню метилирования одиночных CpG-сайтов в образцах, что не позволяло корректно сопоставить стандартные кривые и кривые анализируемых образцов. Для сравнения данных полученные кривые нормировали по образцу с наименьшим метилированием. Для количественной оценки метилирования сравнивались значения относительных единиц интенсивности флуоресценции при температуре максимальных пиков кривых (рис. 1). Результаты представлены в относительных единицах.

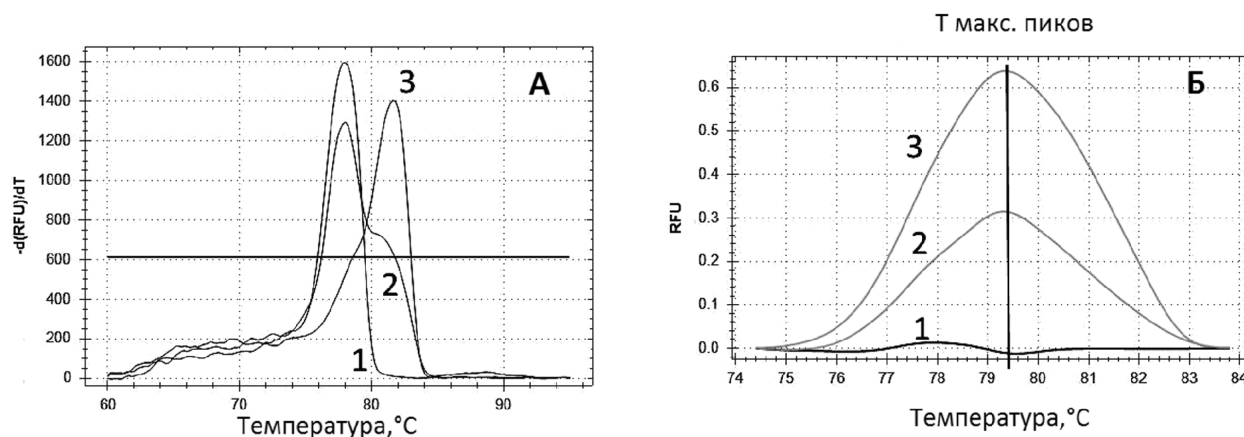


Рисунок 1. Расчёт относительного уровня метилирования по относительным флуоресцентным единицам (RFU) при температуре максимальных пиков кривых HRM (Т макс. пиков). Кривая 1 — неметилированный продукт; кривые 2 и 3 — продукты, состоящие из метилированной и неметилированной фракций. А — исходные кривые плавления. Б — кривые плавления, нормализованные в программе Precision Melt Analysis Software, версия 3 ("BioRad").

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ РМЖ

Протокол:

1. Ткани первичных опухолей замораживали при температуре -80°C .
2. ДНК выделяли из образцов с использованием спин-колонок QIAamp DNA Mini Kit ("Quiagen", США).
3. ДНК модифицировали методом бисульфитной конверсии набором EpiJET Bisulfite Conversion Kit ("Thermo Scientific", США).
4. ПЦР проводили с праймерами к фрагментам CpG-островков исследуемых генов (табл. 1), по следующей программе амплификации: $95^{\circ}\text{C} — 5$ мин; $(95^{\circ}\text{C} — 15$ с, $60^{\circ}\text{C} — 30$ с, $72^{\circ}\text{C} — 45$ с) $\times 30$ циклов; $(95^{\circ}\text{C} — 15$ с, $50^{\circ}\text{C} — 30$ с, $72^{\circ}\text{C} — 45$ с) $\times 25$ циклов.
5. К полученным продуктам добавляли интеркалирующий краситель EVAGreen ("Синтол", Россия).
6. Построение кривой плавления проводили по следующей программе: $95^{\circ}\text{C} — 30$ с; $60^{\circ}\text{C} — 10$ мин; анализ плавления в диапазоне $60^{\circ}\text{C}–90^{\circ}\text{C}$ с шагом $0,2^{\circ}\text{C}$. MS-HRM проводили с использованием программного обеспечения Precision Melt Analysis Software, версия 3 ("BioRad", США).
7. После проведения MS-HRM качество ПЦР-продукта проверяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле (рис. 2).

Для ПЦР и MS-HRM использовали амплификатор CFX96 ("BioRad"). При обработке результатов нормализацию проводили по наименее метилированному продукту (рис. 1, кривая 1).

Для количественной оценки метилирования использовались относительные единицы интенсивности флуоресценции (RFU) при температуре максимальных пиков кривых HRM (рис. 1).

Последовательности ДНК-продуктов были подтверждены методом пиросеквенирования. Для этого исследовали по два ПЦР-продукта на каждый ген с высоким и низким уровнем метилирования, обнаруженным методом MS-HRM по следующему протоколу:

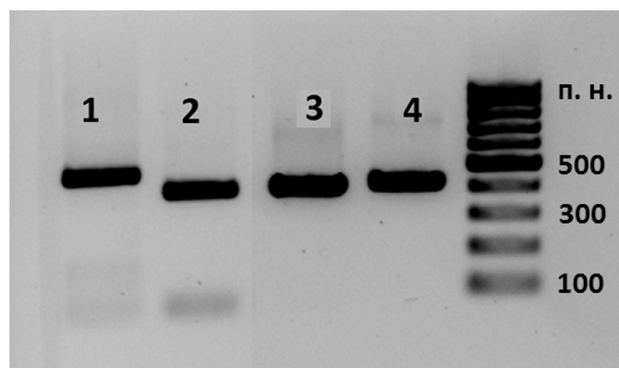


Рисунок 2. Продукты ПЦР: 1 — *WIF1*, 2 — *RASSF1A*, 3 — *CDO1*, 4 — *MEST*. Использован маркер длин ДНК с шагом 100 п.н. ("Thermo Scientific").

1. Отбирали 0,3 мкл ПЦР-продукта.
2. Проводили NEST-ПЦР с праймерами, представленными в таблице 2, программа амплификации: $95^{\circ}\text{C} — 5$ мин; $(95^{\circ}\text{C} — 15$ с, $50^{\circ}\text{C} — 30$ с, $72^{\circ}\text{C} — 45$ с) $\times 12$ циклов.
3. Секвенирование проводили на приборе PyroMark Q48 ("Qiagen", Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Диагностическую ценность метода определяли ROC-анализом. Статистический анализ и построение графиков выполнены в программе SPSS 17 ("SPSS Inc", США) и OriginPro 8.5 ("OriginLab Corporation", США). Полученные результаты не имели нормального распределения. В связи с этим использовали непараметрическую статистику. Для непрерывных значений использовался U-критерий Манна-Уитни, для качественных — критерий хи-квадрат. Корреляцию оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде медианы (верхней квартили; нижней квартили). Качественные характеристики представлены в процентах. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 1. Используемые праймеры для проведения MS-HRM

Ген	Праймер for	Праймер rev	Кол-во CpG-сайтов	Размер, п.н.	ID
<i>WIF1</i>	GAGTGATGTTTATAGGGGT	CCTCAACCAAACTATTCC	46	464	ENSG00000156076
<i>RASSF1A</i>	GGGTAAAGGTATTTAAAGATAAGAA	ACAACCTAATCCCTAACC	36	389	ENSG00000068028
<i>CDO1</i>	GGGAGGATGAATTTATAGATTTG	TAAACTTCCATAATAACCTACACCTC	25	396	ENSG00000129596
<i>MEST</i>	ATTAGGGGAAGGGTTGAAATA	CAAATAAAACCTTACCTACAAAACCTC	26	416	ENSG00000106484

Таблица 2. Используемые праймеры при проведении NEST-PCR для последующего пиросеквенирования

Ген	Праймер for	Праймер rev	Кол-во CpG-сайтов	Размер, п.н.
<i>WIF1</i>	GAGTGATGTTTATAGGGGT	biotinAAACTACATTCACAATAC	8	105
<i>RASSF1A</i>	GTATTGTAGGTTTTTG	biotinACAACCTAATCCCTAACC	12	115
<i>CDO1</i>	GGGAGGATGAATTTATAGATTTG	biotinACCCCCAAACCCCTAACAAC	5	96
<i>MEST</i>	GGTAGTATATGTTGGGTT	biotinCCTTACCTACAAAACCTCCATA	16	189

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 112 пациенток с LumA или LumB- подтипами РМЖ, из которых 47 имели метастазы хотя бы в один РЛУ (табл. 3). Размеры изучаемых опухолей составили от 0,9 до 5 см. Все опухоли были эстроген-рецептор (ЭР) позитивные и HER2-негативные.

В первичных опухолях подтипа LumA в группах пациенток с метастазами и без метастазов в РЛУ не было различий по гистологическому варианту, экспрессии прогестероновых рецепторов (ПР) и уровню Ki67. Статистически значимые различия были по возрасту пациенток и размерам опухолевого узла. В LumB- подтипе в группах пациенток с метастазами и без метастазов в РЛУ не было различий по возрасту пациенток, гистологическому варианту и уровню Ki67. Статистически значимые различия были по размерам опухоли, и экспрессии ПР (табл. 3).

Проведённый анализ относительного уровня метилирования генов *WIF1*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* в первичной опухоли между подтипами LumA и LumB- показал, что *WIF1* и *CDO1* имеют более высокий статистически значимый уровень метилирования в подтипе LumB- ($p<0,001$; $p=0,002$ соответственно). Кроме того, при этом же молекулярном подтипе обнаружено снижение метилирования гена *MEST* ($p=0,033$) (рис. 3). Значительные различия по уровню метилирования исследуемых генов между подтипами LumA и LumB- указывали на необходимость изучения влияния метилирования на метастазирование в РЛУ при каждом подтипе отдельно.

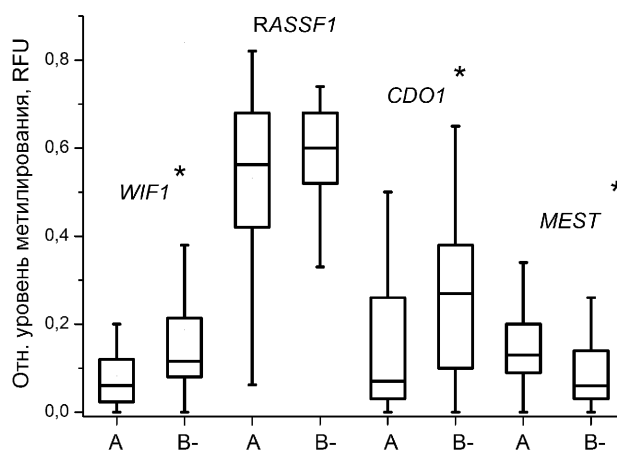


Рисунок 3. Относительный уровень метилирования генов *WIF1*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* в первичной опухоли между подтипами LumA и LumB-. * — $p<0,05$.

При сравнении уровня метилирования между пациентками, имеющими метастазы и не имеющими метастазы в РЛУ в первичной опухоли LumA подтипа, было установлено, что только *WIF1* имел достоверные различия между группами ($p=0,03$) (рис. 4). Корреляционный анализ показал, что уровень метилирования гена *WIF1* взаимосвязан с уровнем метилирования *RASSF1A* ($p=0,001$) и *CDO1* ($p<0,001$) и не коррелирует с размером опухоли. Также было оценено метилирование в опухолях размером больше 2 см. Мы предположили, что опухоли

Таблица 3. Характеристики первичной опухоли исследуемых групп

	Есть метастазы	Нет метастазов	<i>p</i>
LumA	(22)	(44)	
Возраст, лет	56 (45,5;59)	60,55 (53;6)	0,027*
Длина опухоли	2,45 (1,75;3)	1,85 (1,37;2,2)	0,021*
Экспрессия ПР, %	85 (15;100)	90 (35;100)	0,74
Ki67, %	10,5 (6,25; 15)	11,5 (7;15)	0,76
гист. вариант			
протоковый	36,3% (8)	22,7% (10)	0,26
дольковый	31,8% (7)	22,7% (10)	0,55
протоково-дольковый	22,7% (5)	38,6% (17)	0,27
другой	9,2% (2)	16% (7)	0,70
LumB-	(26)	(20)	
Возраст, лет	55 (44,2;59,7)	52,5 (42,7;60,2)	0,68
Длина опухоли	2,7 (2,1;3,0)	2,1 (1,7;2,5)	0,009*
Прогестерон, %	45 (10;77,5)	80 (67,5;95)	0,02*
Ki67, %	28 (25; 43,7)	32,5 (24;37,2)	0,96
гист. вариант			
протоковый	27% (7)	35% (7)	0,75
дольковый	23% (6)	15% (3)	0,71
протоково-дольковый	42,3% (11)	45% (9)	1
другой	7,7% (2)	5% (1)	1

Примечание: * — статистически значимые различия.

малых размеров могут обладать молекулярными свойствами, необходимыми для метастазирования, но не иметь достаточной клеточной массы для реализации метастатического потенциала. В связи с этим опухоли менее 2 см были исключены из анализа. В соответствии с данными требованиями была включена 31 пациентка LumA подтипом, причём 15 из них имели метастазы в РЛУ. Было обнаружено, что в данной ситуации наблюдается увеличение статистической значимости различий между группами при оценке уровня метилирования гена *WIF1* — $p=0,009$. ROC-анализ показал, что AUC (95%CI)=0,76 (0,59–0,93).

Оценка относительного уровня метилирования исследуемых генов в первичной опухоли LumB подтипа показала, что три гена *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* имели статистически значимые различия по уровню метилирования между группами ($p=0,03$; $p=0,048$ и $p=0,045$ соответственно) (рис. 5).

При использовании ROC-анализа было установлено, что при сочетании трёх генов методом логистической регрессии AUC(95%CI) составила 0,74 (0,6–0,88). Корреляционный анализ показал, что уровень метилирования гена *RASSF1A*, имеет обратную корреляцию с геном *MEST* ($p=0,001$) и прямую с *CDO1* ($p=0,025$). При анализе опухолей больше 2 см было отобрано 33 пациентки, у 20 из них имелись метастазы в РЛУ. Статистическая значимость различий между группами в данном случае для генов *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* не увеличилась ($p=0,046$; $p=0,089$ и $p=0,076$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе было рассмотрено метилирование генов *WIF1*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* первичной опухоли молочной железы с целью поиска новых маркеров метастазирования в РЛУ. Мы обнаружили, что уровень метилирования трёх генов (*WIF1*, *CDO1* и *MEST*) статистически значимо отличался у пациенток с подтипами LumA и LumB-.

Это согласуется с результатами других исследований, в которых показано, что подтипы LumA и LumB- имеют различный профиль метилирования [18]. Полученные данные указывали на необходимость рассмотрения каждого подтипа по отдельности.

При изучении LumA подтипа было установлено, что метилирование гена *WIF1* статистически значимо отличалось между опухолями с метастазами и без метастазов в РЛУ. Так как метастазирование значительно зависит от размера опухоли, мы предположили, что опухоли малых размеров могут обладать молекулярными свойствами, необходимыми для метастазирования, но не иметь достаточной клеточной массы для реализации метастатического потенциала. Исходя из данного предположения, мы ожидали, что при больших размерах опухоли метастазирование будет более зависимо от молекулярных особенностей, чем при рассмотрении всей выборки. Результаты подтвердили наше предположение: оказалось, что статистическая значимость различий между группами при сравнении метилирования гена *WIF1* возросла при изучении опухолей размером не менее 2 см. Таким образом, мы обнаружили, что оценка уровня метилирования в опухолях более 2 см позволяет точнее предсказать наличие метастазов, чем при рассмотрении всей группы. Полученные результаты указывают на важность метилирования гена *WIF1* при метастазировании в РЛУ у пациенток с LumA подтипом РМЖ. О функциях белкового продукта данного гена известно, что *WIF1* (Wnt inhibitory factor) является антагонистом Wnt-сигнального пути, управляющего различными внутриклеточными механизмами, в частности, клеточным делением и лимфоангиогенезом [19], что может играть ключевую роль в процессах регионарного метастазирования.

При рассмотрении LumB- подтипа было установлено, что три гена *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* имели статистически значимые различия по уровню метилирования между опухолями с метастазами

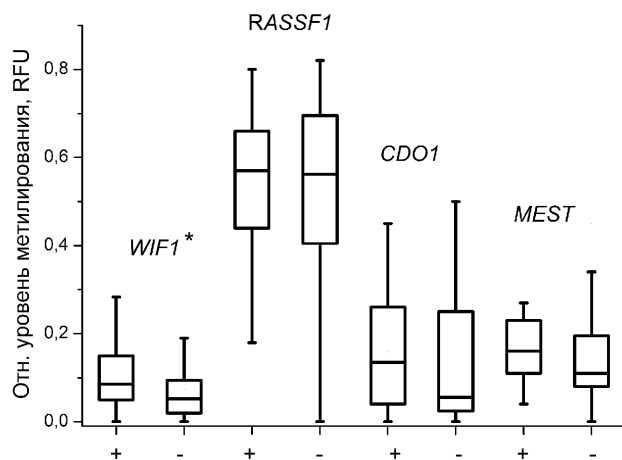


Рисунок 4. Относительный уровень метилирования генов *WIF1*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* в первичной опухоли подтипа LumA между пациентками, имеющими метастазы и не имеющими метастазов в РЛУ. “+” — есть метастазы, “-” — нет метастазов, * — $p<0,05$.

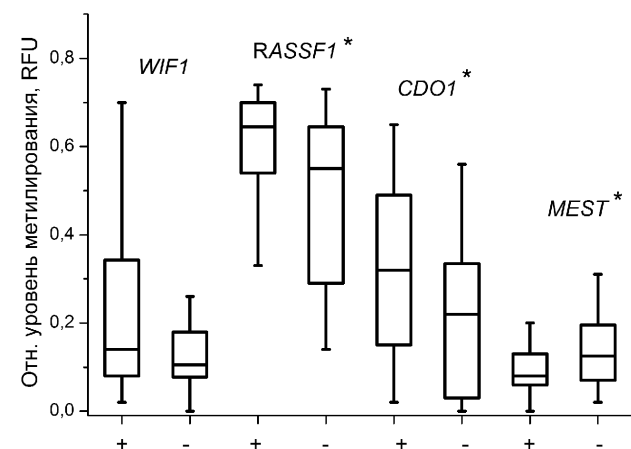


Рисунок 5. Относительный уровень метилирования генов *WIF1*, *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* в первичной опухоли подтипа LumB между пациентками, имеющими метастазы и не имеющими метастазов в РЛУ. “+” — есть метастазы, “-” — нет метастазов, * — $p<0,05$.

и без метастазов в РЛУ. ROC-анализ показал, что использование всех трёх генов для диагностики метастазирования характеризуется хорошей диагностической ценностью и данные гены могут быть рассмотрены как потенциальные маркеры метастазирования. При анализе опухолей размером более 2 см статистическая значимость различий между группами для генов *RASSF1A*, *CDO1* и *MEST* не увеличилась, что может указывать, на то, что данные гены не являются ключевыми для регионарного метастазирования. Уровень метилирования гена *WIF1* не оказывал влияния на образование метастазов в РЛУ, однако, при сравнении с уровнем метилирования *WIF1* в опухолях LumA подтипа, где наблюдается выраженная связь между метилированием и метастазированием, обнаруживается значительное повышение метилирования данного гена. Это может указывать на возможность связи между повышенным уровнем метилирования *WIF1* в опухолях LumB- подтипа и формированием регионарных метастазов.

При рассмотрении корреляций уровня метилирования между генами отмечена выраженная взаимосвязь в каждом подтипе. Эти результаты указывают на тот факт, что с расширением местного распространения опухоли, выраженном в регионарном метастазировании, наблюдается изменение профиля метилирования генов.

Таким образом, метилирование генов наряду с другими молекулярными характеристиками первичной опухоли, позволяет с высокой степенью вероятности предсказать метастазирование в РЛУ и даёт возможность максимально персонализировать объем аксиллярной хирургии у пациенток РМЖ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках государственного задания “Персонализация хирургического лечения больных раком молочной железы с использованием математической модели оценки индивидуального риска регионарного метастазирования”, регистрационный номер АААА-А18-118053190016-9.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

На проведение исследования получено разрешение комиссии по этике Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Протокол №4 от 23.04.2020 г.). Перед забором биологического материала все женщины подписали информированное согласие на участие в клиническом исследовании.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Canavese G, Catturich A, Vecchio C, Tomei D, Gipponi M, Villa G, Carli F, Bruzzi P, Dozin B. (2009) Ann. Oncol., **20**(6), 1001-1007.
2. Krag D.N., Anderson S.J., Julian T.B., Brown A.M., Harlow S.P., Costantino J.P., Ashikaga T., Weaver D.L., Mamounas E.P., Jalovec L.M., Frazier T.G., Noyes R.D., Robidoux A., Scarth H.M., Wolmark N. (2010) Lancet Oncol., **11**(10), 927-933.
3. Veronesi U., Viale G., Paganelli G., Zurrada S., Luini A., Galimberti V., Veronesi P., Intra M., Maisonneuve P., Zucca F., Gatti G., Mazzarol G., de Cicco C., Vezzoli D. (2010) Ann. Surg., **251**(4), 595-600.
4. Giuliano A.E., Hunt K.K., Ballman K.V., Beitsch P.D., Whitworth P.W., Blumencranz P.W., Leitch A.M., Saha S., McCall L.M., Morrow M. (2011) JAMA, **305**(6), 569-575.
5. Wilke L.G., McCall L.M., Posther K.E., Whitworth P.W., Reintgen D.S., Leitch A.M., Gabram S.G., Lucci A., Cox C.E., Hunt K.K., Herndon J.E., 2nd, Giuliano A.E. (2006) Ann. Surg. Oncol., **13**(4), 491-500.
6. Mansel R.E., Fallowfield L., Kissin M., Goyal A., Newcombe R.G., Dixon J.M., Yiangou C., Horgan K., Bundred N., Monypenny I., England D., Sibbering M., Abdullah T.I., Barr L., Chetty U., Sinnett D.H., Fleissig A., Clarke D., Ell P.J. (2006) J. Nat. Cancer Inst., **98**(9), 599-609.
7. Jones D., Pereira E.R., Padera T.P. (2018) Front. Oncol., **8**, 36. DOI: 10.3389/fonc.2018.00036.
8. Sopik V., Narod S.A. (2018) Breast Cancer Res. Treatm., **170**(3), 647-656.
9. Fisher B., Slack N.H., Bross I.D. (1969) Cancer, **24**(5), 1071-1080.
10. Chua B., Ung O., Taylor R., Boyages J. (2001) ANZ J. Surg. **71**(12), 723-728.
11. Chen M., Palleschi S., Khoyneshad A., Gecelter G., Marini C.P., Simms H.H. (2002) Arch. Surg., **137**(5), 606-610.
12. Reyngold M., Turcan S., Giri D., Kannan K., Walsh L.A., Viale A., Drobnjak M., Vahdat L.T., Lee W., Chan T.A. (2014) PLoS One, **9**(8), e103896. DOI: 10.1371/journal.pone.0103896.
13. Shinozaki M., Hoon D.S., Giuliano A.E., Hansen N.M., Wang H.J., Turner R., Taback B. (2005) Clin. Cancer Res., **11**(6), 2156-2162.
14. Shivakumar L., Minna J., Sakamaki T., Pestell R., White M.A. (2002) Mol. Cell. Biol., **22**(12), 4309-4318.
15. Brait M., Ling S., Nagpal J.K., Chang X., Park H.L., Lee J., Okamura J., Yamashita K., Sidransky D., Kim M.S. (2012) PLoS One, **7**(9), e44951. DOI: 10.1371/journal.pone.0044951.
16. Karbiener M., Glantschnig C., Pisani D.F., Laurencikiene J., Dahlman I., Herzig S., Amri E.Z., Scheideler M. (2015) Int. J. Obesity, **39**(12), 1733-1741.
17. Wojdacz T.K., Dobrovic A., Hansen L.L. (2008) Nature Protocols, **3**(12), 1903-1908.
18. Holm K., Hegardt C., Staaf J., Vallon-Christersson J., Jönsson G., Olsson H., Borg A., Ringnér M. (2010) Breast Cancer Res., **12**(3), R36. DOI: 10.1186/bcr2590.
19. Tortolero G.G., Reis R.R., de Almeida Mendes F., Abreu J.G. (2017) Cell. Signal., **40**, 30-43.

Поступила в редакцию: 03. 07. 2020.
После доработки: 17. 12. 2020.
Принята к печати: 20. 02. 2021.

METHYLATION PROFILES OF GENES IN BREAST CANCER
LUMINAL HER2-NEGATIVE PRIMARY TUMOR DURING REGIONAL LYMPH NODE METASTASIS

A.M. Krasnyi, S.V. Kurevlev, A.A. Sadekova, T.G. Sefikhanov, V.V. Kometova, V.V. Rodionov*

Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
4 Acad. Oparina str., Moscow, 117997 Russia; *e-mail: alexred@list.ru

Aberrant methylation is strongly associated with development of cancer, but limited data exist on correlation between methylation and regional lymph node metastasis (RLNM). The aim of this research was to study using of methylation levels of *WIF1*, *RASSF1A*, *CDO1* and *MEST* aberrant methylated genes in a primary breast cancer for prediction of regional lymph node metastases. We used MS-HRM (Methylation Sensitive High Resolution Melting) to assess methylation levels. The results were confirmed by pyrosequencing. The study included 66 women with LumA and 46 women with HER2- (LumB-), 22 and 26 of them had metastasis in at least one lymph node respectively. It was found that methylation levels between LumA and LumB subtypes differed significantly in genes: *WIF1* ($p < 0.001$), *CDO1* ($p = 0.002$) and *MEST* ($p = 0.033$). In the Lum A subtype statistically significant differences in level of methylation of *WIF1* gene between patients with metastases in RLNM and patients without metastases were found ($p = 0.03$). Analysis of tumors longer than 2 cm in the LumA subtype, revealed an increase of statistical significance of *WIF1* gene — $p = 0.009$ (AUC (95%CI) = 0.76 (0.59–0.93)). In LumB- subtype *RASSF1A*, *CDO1* and *MEST* had statistically significant differences in methylation level between groups ($p = 0.03$, $p = 0.048$ and $p = 0.045$ respectively). ROC analysis showed that combining of three genes by logistic regression, AUC (95%CI) was 0.74 (0.6–0.88). Analysis of tumors longer than 2 cm, did not increase statistical significance for these genes ($p = 0.046$; $p = 0.089$ and $p = 0.076$, respectively). Thus, the study of methylation in primary tumors may be useful for prediction of lymph node metastasis, as well as for better understanding of biological process inside breast cancer.

Key words: methylation; primary tumor; breast cancer; lymph node metastases; LumA; LumB

Funding. The work was carried out as part of the State Assignment “Personification of the surgical treatment of patients with breast cancer using a mathematical model for assessing the individual risk of regional metastasis”. Registration no. AAAA-A18-118053190016-9.

Received: 03.07.2010, revised: 17.12.2020, accepted: 20.02.2021.