

На правах рукописи

СКРЯБИН

Николай Алексеевич

**РОЛЬ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ
И АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
В РАЗВИТИИ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ
ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.02.07 – генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Томск – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте медицинской генетики Сибирского отделения РАМН, г. Томск

Научные руководители:

доктор биологических наук
Лебедев Игорь Николаевич
доктор медицинских наук, профессор
Завьялова Марина Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Уразова Людмила Николаевна
кандидат медицинских наук
Назаренко Мария Сергеевна

Ведущая организация:

**Учреждение Российской академии
медицинских наук
Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии
и биофизики Сибирского отделения
РАМН**

Защита состоится «___» _____ 2011 года в ____ часов на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте медицинской генетики Сибирского отделения РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ медицинской генетики Сибирского отделения РАМН.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Кучер А.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Высокая частота заболеваемости и смертности от рака молочной железы (РМЖ) женщин во всем мире обуславливает повышенный интерес исследователей к данной патологии (Комарова, 2008; Давыдов, Аксель, 2009). Однако как этиология, так и патогенез данного заболевания до сих пор остаются не до конца изученными, поскольку генетически обусловленные случаи РМЖ ограничиваются только 5-8 % (Карпухин и др., 2002; Любченко и др., 2007; Коваленко и др., 2008; Foulkes, 2008). На данный момент общепринятой является мутационная концепция канцерогенеза, которая подразумевает, что за инициацию и прогрессию опухоли ответственны генные мутации. При этом другие нарушения генетического аппарата клеток, такие как хромосомные aberrации и эпигенетические аномалии, отходят на второй план, рассматриваясь как следствие возрастающей геномной нестабильности, хотя они, также как и генные мутации, являются неотъемлемым компонентом неопластической трансформации.

На сегодняшний день встречаются различные мнения по поводу роли хромосомных aberrаций в процессах малигнизации. В 1999 году Питер Дьюсберг сформулировал анеуплоидную гипотезу канцерогенеза, согласно которой возникновение и рост опухоли в большей степени связаны с ошибками в распределении хромосом, чем с накоплением генных мутаций (Duesberg, 1999). Основные положения данной гипотезы подтверждаются рядом исследований, в которых продемонстрировано, что хромосомные аномалии являются одними из ранних генетических нарушений, приводящих к индукции нестабильности генома клетки и, как следствие, к её злокачественной трансформации (Sneige et al., 2006; Lv et al., 2008; Gao et al., 2009). Существует обширная база данных «Progenetix» (www.progenetix.com), в которой на настоящий момент (ноябрь 2011 г.) собраны результаты 954 молекулярно-цитогенетических исследований 29069 опухолей различной локализации, в том числе 2127 случаев РМЖ, демонстрирующие существенный вклад хромосомных aberrаций в развитие онкологических заболеваний. В то же время, в ряде случаев хромосомные аномалии рассматриваются как следствие различных генетических и эпигенетических нарушений, таких как аномалии сегрегации центросом и дисфункции теломер, точковые мутации в различных онкогенах и онкосупрессорах, гиперметилирование генов, ответственных за репарацию ДНК и регуляцию клеточного цикла (Соколенко и др., 2008; Salisbury, 2001; Donate, Blasco, 2011).

В последнее время в мировой литературе начинают накапливаться данные, указывающие на значительный вклад и эпигенетических aberrаций в инициацию и развитие злокачественного процесса (Залетаев и др., 2004; Kuznetsova et al., 2007; Esteller, 2008; Feinberg, 2010; Vlassov et al., 2010). В 2006 году Эндрю Фейнберг с соавторами выдвинули гипотезу, согласно которой фундаментальной основой рака являются эпигенетические нарушения генов-инициаторов опухоли в стволовых клетках или клетках-предшественниках (Feinberg et al., 2006). Не вызывает сомнения и тот факт, что эпигенетические нарушения являются важнейшими атрибутами клетки с уже инициированным злокачествен-

ным процессом. Следовательно, изучение эпигенетического статуса генома при раке является необходимым элементом для более глубокого понимания механизмов злокачественной трансформации и для выявления нового поколения биомаркеров с целью ранней диагностики онкологических заболеваний. В основе эпигенетических изменений генной экспрессии лежат стабильные, наследуемые, но потенциально обратимые ковалентные модификации хроматина, такие как метилирование цитозиновых оснований ДНК и химические изменения гистонов (ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование). Аномалии метилирования ДНК при раке представлены в основном гиперметилированием промоторных регионов онкосупрессорных генов, а так же глобальным гипометилированием всего генома. Согласно результатам некоторых исследований, нарушения статуса метилирования возникают задолго до развития клинически выраженного рака (Euhus et al., 2008; Park et al., 2011). Актуальность изучения эпигенетических аномалий обуславливается также работами, которые свидетельствуют о большом диагностическом потенциале aberrантного метилирования внеклеточной циркулирующей ДНК в периферической крови больных с онкологическими заболеваниями (Рыкова и др., 2008; Тамкович и др., 2008; Vlassov et al., 2010).

Вопросы о первичности и взаимосвязи генных, хромосомных, либо эпигенетических аномалий в индукции геномной нестабильности в процессе развития онкологических заболеваний, в том числе и РМЖ, остаются открытыми и являются предметом дискуссий (Имянитов, 2010; Lotem, Sachs, 2002; Slattery et al., 2011). Также возникают вопросы, касающиеся роли вышеуказанных нарушений генома в развитии определенных признаков злокачественной трансформации клеток, например, метастазирования. Все вышесказанное указывает на актуальность исследований, которые раскрывают вопросы патогенетики РМЖ как с цитогенетических, так и с эпигенетических позиций.

Цель исследования: Оценить вклад хромосомных нарушений и аномалий метилирования ДНК в развитие геномной нестабильности при раке молочной железы.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ спектра несбалансированных хромосомных aberrаций в тканях молочной железы с доброкачественными и злокачественными новообразованиями, а также в регионарных лимфатических узлах с метастазами.
2. Определить связь наиболее частых хромосомных aberrаций с клиническими параметрами у больных раком молочных желез.
3. Выявить спектр дифференциально метилированных последовательностей ДНК в тканях молочной железы с доброкачественными и злокачественными новообразованиями и регионарных лимфатических узлах с метастазами.
4. Изучить статус метилирования генов ретинобластомного пути регуляции клеточного цикла в тканях молочной железы в зависимости от уровня хромосомных aberrаций.

Научная новизна исследования: В ходе настоящего исследования впервые определены особенности цитогенетических и эпигенетических нарушений, обуславливающих развитие геномной нестабильности при раке молочной железы. Выявлено, что существенное увеличение частоты хромосомных aberrаций происходит после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные. Показана протективная роль делеции хромосомного субсегмента 16q12.1 для больных раком молочной железы. С помощью широкогеномного анализа эпигенетического статуса 807 онкогенов и опухолесупрессорных генов впервые установлено, что ткани молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазы в регионарные лимфатические узлы являются сходными по профилю метилирования ДНК, что указывает на обособление клона клеток с метастатическим фенотипом на ранних этапах злокачественной трансформации.

Практическая значимость: Полученные результаты расширяют представления о цитогенетических и эпигенетических механизмах прогрессии рака молочной железы. Комбинированное использование методов широкогеномного анализа профиля метилирования ДНК и молекулярно-цитогенетического анализа хромосомных aberrаций может быть применено при комплексных молекулярно-генетических исследованиях злокачественных новообразований других локализаций. На основании результатов анализа связи цитогенетических и эпигенетических аномалий в опухолевой ткани с патогенетически значимыми характеристиками злокачественного процесса могут быть разработаны дополнительные критерии оценки клинического течения рака молочной железы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установление специфичного профиля метилирования ДНК в клетках, ответственных за возникновение лимфогенных метастазов при раке молочной железы, происходит на начальных этапах процесса малигнизации.
2. Усиление хромосомной нестабильности при развитии рака молочной железы происходит после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные.
3. Делеция хромосомного субсегмента 16q12.1 в неопластических клетках у больных раком молочной железы ассоциирована с опухолями меньших размеров.

Апробация работы: Основные результаты диссертационного исследования были представлены на Российской научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы» (Томск, 2008), IV и VI региональных конференциях молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2009 и 2011), Международном симпозиуме в рамках Сибирско-Тайваньского Форума «Опыт и перспективы развития и сотрудничества между российскими и тайваньскими учеными в области изучения молекулярно-генетических механизмов развития злокачественных новообразований и использования результатов фундаментальных исследований в онкологии» (Томск, 2009), научно-практической кон-

ференции с международным участием «Актуальные проблемы медицинской генетики на крайнем севере» (Якутск, 2009), VI и VII Российских конференциях по фундаментальной онкологии «Фундаментальная онкология – Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 2010 и 2011), Европейской конференции по генетике человека (European Human Genetics Conference) (Амстердам, Нидерланды, 2011), IX научной конференции памяти профессора С.А. Назаренко «Генетика человека и патология: Актуальные проблемы современной цитогенетики» (Томск, 2011), межлабораторном научном семинаре Учреждения РАМН НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск, 2011).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 в журналах перечня ВАК.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Данные проиллюстрированы 21 таблицей, 17 рисунками и 1 приложением. Библиографический указатель включает 173 источника, из них 23 работы отечественных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал для исследования был получен от 41 женщины, больной РМЖ. Всего было обследовано 7 образцов ткани молочной железы с проявлениями доброкачественных пролиферативных процессов, 40 образцов опухолевой ткани, 6 образцов ткани регионарных лимфатических узлов (РЛУ) с метастазами и 6 условно-контрольных образцов, которые представляли собой образцы тканей молочной железы без гистологических изменений (рис. 1).

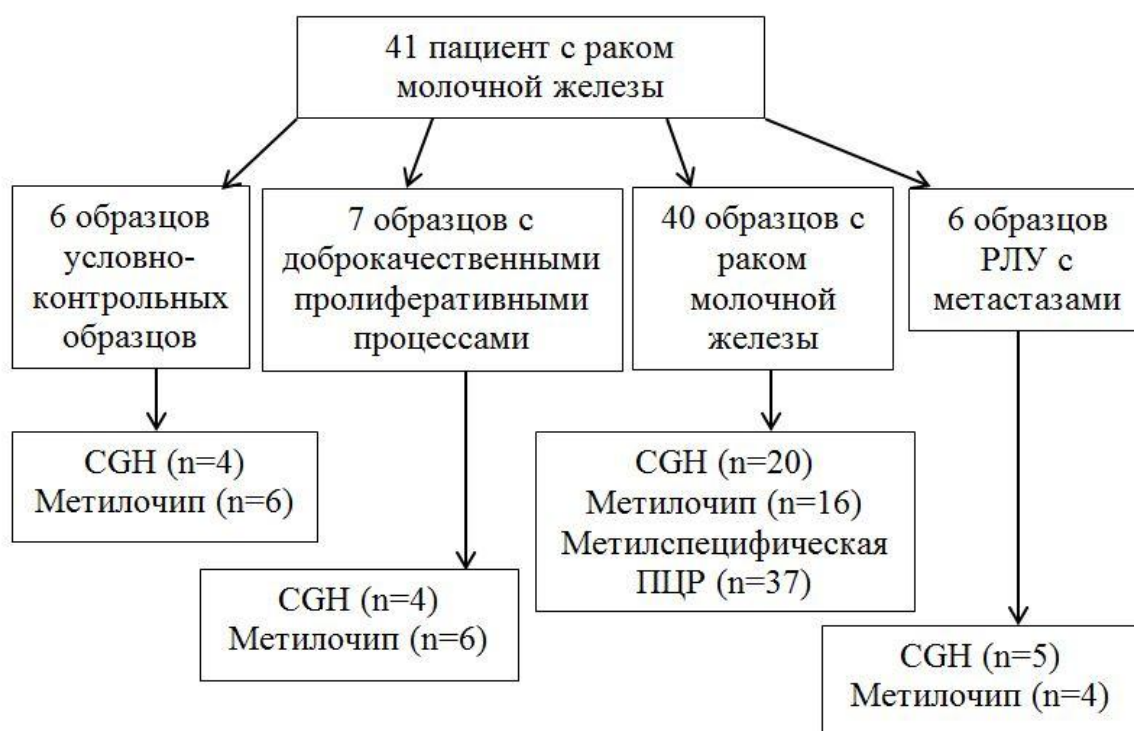


Рис. 1. Структура и объем обследованных выборок.

Молекулярно-цитогенетический анализ проводили с помощью сравнительной геномной гибридизации высокого разрешения (HR-CGH, High Resolution Comparative Genomic Hybridization). Образцы ДНК были выделены с использованием стандартного фенол-хлороформного метода. Значимость различий между числом несбалансированных хромосомных aberrаций в исследованных группах, а также корреляцию частоты наиболее частых хромосомных перестроек с размером опухоли, менструальным статусом и статусом рецепторов ER, PR, HER2 оценивали с помощью точного критерия Фишера. U-критерий Манна-Уитни использовался для анализа корреляции частоты хромосомных аномалий с возрастом обследованных индивидов и числом пораженных лимфатических узлов.

Анализ профиля метилирования ДНК был выполнен с помощью метило-чипа «GoldenGate Methylation Cancer Panel I» («Illumina», США), включающего 1505 CpG-динуклеотидов, локализованных в 807 опухолесупрессорных генах и онкогенах. Мечение, гибридизация ДНК и детекция сигналов были проведены на базе ЗАО «Геноаналитика» (г. Москва). Для выявления дифференциально метилированных генов использовали значение индекса метилирования $\beta = 17\%$, что соответствует уровню разрешения метода (O'Riain et al., 2009).

Для группировки исследованных образцов тканей по профилю метилирования ДНК применяли иерархический кластерный анализ с использованием Евклидова расстояния и метода полных связей. Представленность образцов в кластерах рассчитывалась с помощью точного теста Фишера. Гены, дифференциально метилированные между разными кластерами, выявляли с помощью U-критерия Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнения (FDR). Функциональная классификация дифференциально метилированных генов была проведена с помощью веб-ресурса Gene Set Analysis Toolkit V2 (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>), в котором оценивается представленность генов, группированных согласно базе данных «Gene Ontology».

Анализ статуса метилирования ДНК промоторных областей генов, участвующих в ретинобластомном пути регуляции клеточного цикла (*RB1*, *p14ARF*, *CDKN2B*), проводили с помощью метилспецифической-ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров и условий, описанных в литературе (Esteller et al., 2001; Roncalli et al., 2002; Gonzalez-Gomez et al., 2003). Связь уровня хромосомных aberrаций со статусом метилирования генов *RB1*, *p14ARF*, *CDKN2B* оценивали с помощью точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-цитогенетический анализ тканей молочной железы и регионарных лимфатических узлов. В образцах тканей нормального эпителия молочной железы число хромосомных aberrаций варьировало от 2 до 10 на образец ткани, в среднем на один образец приходилось 6,5 различных хромосомных нарушений. Число амплификаций в некоторых образцах достигало 10, а число делеций – 7. Среднее число амплификаций составило 3,7, а делеций – 2,7 на образец. Среднее число хромосомных сегментов, затронутых хромосомными

нарушениями, составило 18,7 на образец ткани. Хромосомные аномалии были выявлены во всех образцах. Чаще всего встречались такие aberrации, как амплификация 2p13 и делеция 19q13.3-q13.4. Наличие хромосомных перестроек в тканях с нормальным эпителием может быть обусловлено тем, что все образцы были получены от женщин с верифицированным РМЖ, также необходимо учитывать то, что всем пациенткам, от которых был получен данный материал, была проведена неоадьювантная химиотерапия.

В тканях с доброкачественными пролиферативными процессами число хромосомных aberrаций варьировало от 5 до 18 на образец ткани, в среднем на один случай приходилось 10 различных хромосомных нарушений. Число амплификаций в некоторых образцах достигало 6, а число делеций – 12. Среднее число амплификаций составило 3, а делеций – 7 на образец. Среднее число хромосомных сегментов, затронутых хромосомными нарушениями, составило 32,5 на образец ткани. Был выявлен всего один хромосомный сегмент с амплификацией (14q21), который встречался более чем у одного пациента. Число сегментов с делециями, которые встречались более чем у одного пациента, составило 28: 1p35-p36.2 (включающий 3 сегмента: 1p35, 1p36.1 и 1p36.2), 9q12-q21, 11q13, 16p11.2-p12, 16q12.1-q22, 17p11.2-p13, 19p, 19q13.1-q13.2 и 20q11.2-q13.2. Также частой аномалией являлась моносомия хромосомы 22.

Во всех 20 образцах опухолевой ткани были обнаружены множественные хромосомные aberrации: число аномалий варьировало от 1 до 27, в среднем на один случай приходилось 14,1 различных хромосомных нарушений. Число амплификаций в некоторых образцах достигало 26, а число делеций – 14. Среднее число амплификаций составило 8,9, а делеций – 5,2 на образец. Среднее число хромосомных сегментов, затронутых хромосомными перестройками, составило 48,7 на образец ткани. Наиболее частыми являлись амплификации в сегментах 1p31, 1q23, 1q24-q25, 1q31, 1q32, 1q41, 1q42, 1q43-q44, 3q24, 8q22, 8q23, 10q22 и делеции в сегментах 9q13, 9q21, 16q12.1, 16q12.2-q13, 16q21. В целом спектр хромосомных aberrаций в образцах опухолей молочной железы, выявленный в настоящем исследовании, соответствует описанным в литературе и является характерным для опухолей данной локализации (Baudis, 2007; Heim, Mitelman, 2009). Самой частой аномалией оказалась делеция в субсегменте 16q12.1, зарегистрированная в 47 % обследованных образцов, что также соответствует данным литературы (Xu et al., 2008; Green et al., 2009; Natrajan et al. 2009).

В группе образцов с метастазами в регионарные лимфатические узлы также обнаружены множественные хромосомные aberrации: число aberrаций варьировало от 6 до 20, в среднем на один случай приходилось 12,2 различных хромосомных нарушений. Число амплификаций в некоторых образцах достигало 13, а число делеций – 7. Среднее число амплификаций составило 10, а делеций – 2,2 на образец. Среднее число хромосомных сегментов, затронутых хромосомными перестройками, составило 33,8 на образец. Хромосомные аномалии наблюдались во всех исследованных образцах. Наиболее частыми являлись амплификации в сегментах 2p22, 3p14-p21, 3q22-q26.1, 4q28, 5q21, 6q22, 8q21-q24.1, 13q21-q22, 20q13.1-q13.3 и делеции в сегментах 11q12-q13.

В группах образцов с РМЖ и метастазами в РЛУ отмечается значительное превалирование амплификаций над делециями, в то время как в группе образцов с доброкачественными пролиферативными процессами наблюдается противоположная картина. Соотношение амплификаций и делеций в группе с доброкачественными новообразованиями статистически значимо отличается от групп с РМЖ (OR = 3,96; 95 % CI: 1,84-8,64; $p = 0,0001$) и метастазами в РЛУ (OR = 10,61; 95 % CI: 3,78-30,67; $p < 0,0001$) (табл. 1).

Таблица 1

Число хромосомных aberrаций в исследованных группах

Образцы	Число хромосомных aberrаций	
	Амплификации	Делеции
Нормальный эпителий	15	11
Доброкачественные новообразования	12	28
РМЖ	178	105
Метастазы в РЛУ	50	11

Похожие результаты были выявлены в другом исследовании, где было обнаружено превалирование амплификаций над делециями в образцах со злокачественными новообразованиями молочной железы (114 амплификаций и 35 делеций), в то время как в образцах с доброкачественными новообразованиями наблюдалось превалирование делеций над амплификациями (30 амплификаций и 37 делеций) (Lv et al., 2008). По мнению авторов, это свидетельствует о значительной роли амплификаций в процессах злокачественной трансформации.

При сравнении образцов из различных групп у одних и тех же пациенток больше всего одинаковых сегментов с хромосомными aberrациями было зарегистрировано между опухолевыми тканями и метастазами в регионарные лимфатические узлы ($n = 28$), затем между тканями с доброкачественными и злокачественными новообразованиями ($n = 10$) и меньше всего одинаковых хромосомных сегментов с аномалиями было выявлено между образцами с доброкачественными новообразованиями и метастазами в РЛУ ($n = 3$). В целом, в образцах с РМЖ и метастазами в РЛУ число общих хромосомных сегментов затронутых aberrациями, оказалось статистически значимо выше, чем в образцах с доброкачественными и злокачественными новообразованиями (OR = 2,98; 95 % CI: 1,36-6,70; $p = 0,002$). Общие цитогенетические аномалии, выявленные в тканях с доброкачественными и злокачественными новообразованиями, возможно, возникли до разделения клона клеток со злокачественным фенотипом. Следовательно, общие хромосомные aberrации, детектированные в образцах с РМЖ и метастазами в РЛУ, могли возникнуть только после образования клеток с фенотипом злокачественной опухоли. Данная находка может указывать на то, что вероятность возникновения хромосомных aberrаций увеличивается после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные.

Корреляция хромосомных aberrаций с клиническими параметрами у больных раком молочной железы. В проведенном нами исследовании амплификации сегментов 1p31 и 1q24-q25 коррелировали с опухолями, соответ-

ствующими T₂₋₄ по TNM-классификации (опухоли более 2 см) (Виттекинд и др., 2007), т.е. были ассоциированы с большими размерами опухоли ($p = 0,022$ и $p = 0,028$, соответственно), в то время как делеция субсегмента 16q12.1 коррелировала с опухолями, соответствующими T₁ (опухоль менее 2 см) ($p = 0,028$). Можно предположить, что в амплифицированных сегментах локализованы онкогены, играющие значительную роль в накоплении клеточной массы. Так, например, было показано, что амплификация субсегментов 1p31.3-p32.3 встречается во всех образцах синхронных спорадических опухолей молочной железы, исследованных при помощи матричной CGH (Ghazani et al., 2007).

У женщин с делецией 16q12.1 в проведенном нами исследовании чаще выявлялись опухоли, размеры которых были менее двух сантиметров, что может быть свидетельством медленного роста опухоли в данной группе пациентов. Протективная роль делеции хромосомного субсегмента может быть результатом наличия в нем онкогена, утрата которого и обуславливает медленное накопление клеточной массы. При анализе сегмента 16q12.1 на предмет наличия в нем онкогенов обратил на себя внимание локус, содержащий гены – *TNRC9* и *LOC643714*. В рамках полногеномного ассоциативного исследования (GWAS – Genome-wide association study), проведенного в Европейских странах и охватившего 4398 пациентов с РМЖ и 4316 индивидов контрольной группы, в пределах данного локуса был выявлен однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs3803662: C>T, связанный с риском развития РМЖ (OR = 1,20; 95 % CI: 1,16-1,24; $p = 10^{-36}$) (Easton et al., 2007). Ген *TNRC9* кодирует белок, содержащий высокомобильную группу (HMG – high mobility group), которая участвует в спирализации ДНК и изменении структуры хроматина. Так же имеются данные, свидетельствующие о том, что данная группа может выступать в качестве транскрипционного фактора, обладающего онкогенными свойствами (Easton et al., 2007; Liang et al., 2010; Ruiz-Narváez et al., 2010). Можно предположить, что делеция субсегмента 16q12.1, содержащего полиморфизм rs3803662: C>T, ассоциированный с высокопенетрантным онкогеном, может ингибировать процессы злокачественной трансформации и роста опухоли.

Была найдена корреляция амплификации сегментов 1q42 и 1q43-q44 с сохраненным менструальным статусом ($p = 0,009$ и $p = 0,015$, соответственно). В пределах сегментов 1q42.1-q43 локализован ген *BRCA1* (breast cancer associated antigen 1), для которого показано повышение экспрессии при РМЖ, что, в свою очередь, ассоциировано с увеличением уровня рецепторов эстрогена (Cui et al., 2004). Как известно, эстроген является сильным внеклеточным пролиферативным фактором, следовательно, у женщин с сохраненным менструальным статусом, наличие рецепторов к эстрогену в опухолевых тканях стимулирует клеточную пролиферацию. Также была выявлена отрицательная корреляция амплификации 1q41 с числом пораженных лимфатических узлов ($p = 0,034$). Амплификация 1q41 является частой хромосомной перестройкой при злокачественных новообразованиях молочной железы, к тому же в литературе имеются факты, свидетельствующие о протективной роли амплификации данного сегмента при РМЖ (Möllerström et al., 2010). Других корреляций частых хромо-

сомных aberrаций с числом пораженных лимфатических узлов, а также с возрастом пациенток и статусом рецепторов ER, PR и HER2 обнаружено не было.

Межгрупповой анализ дифференциального метилирования генов в тканях молочной железы и регионарных лимфатических узлах с метастазами. В результате проведенного анализа были получены профили метилирования 1505 CpG-сайтов, однако в дальнейший анализ нами были включены 1260 CpG-сайтов, относящихся к 730 генам. Остальные 245 были либо с низким уровнем достоверности детекции, либо были локализованы на X хромосоме, случайная инактивация которой осуществляется за счет тотального метилирования. При сравнении образцов с доброкачественными новообразованиями молочной железы и образцов с гистологически нормальным эпителием из 1260 CpG-сайтов дифференциально метилированными оказались 26 (2,06 %). Из них гиперметилированными и гипометилированными оказались по 13 CpG-сайтов. Гиперметилированные гены, выявленные в группе доброкачественных новообразований, были представлены в 3 группах генов по классификации «Gene Ontology»: гены, ответственные за регуляцию адгезии клеток ($n = 2$), гены, участвующие в остановке клеточного цикла ($n = 2$), и гены иммунного ответа ($n = 4$). Поскольку в результате молекулярно-цитогенетического исследования было выявлено, что большая часть хромосомных aberrаций возникает после разделения доброкачественных и злокачественных новообразований, можно предположить, что геномная нестабильность инициируется в тканях с доброкачественными новообразованиями. С этой точки зрения, выявленное гиперметилирование генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, может быть частью комплекса аномалий, приводящих к геномной нестабильности, и заслуживает особого внимания. Гипометилированные гены, выявленные в образцах тканей с доброкачественными новообразованиями, относились к 3 группам: гены, ответственные за межклеточную адгезию ($n = 2$), подвижность клеток ($n = 2$) и регуляцию роста клеток ($n = 2$).

Из 1260 исследованных CpG-сайтов в группе образцов со злокачественными новообразованиями по сравнению с группой образцов с нормальным эпителием было выявлено 318 дифференциально метилированных CpG-сайтов (25,2 %), из которых 252 (79,2 %) показали увеличение, а 66 (20,8 %) снижение уровня метилирования. В данной группе большинство дифференциально метилированных CpG-сайтов встречались в единичных образцах, что свидетельствует об усилении эпигенетической нестабильности, которая приводит к увеличению частоты неспецифического метилирования. Дифференциальное метилирование в более чем 30 % обследованных образцов было выявлено только в 62 CpG-сайтах (19,4 %), 46 из которых оказались гиперметилированными (74,1 %), а 16 – гипометилированными (25,9 %). Гиперметилированные гены, выявленные в злокачественных новообразованиях, были представлены в 2 группах: гены, ответственные за позитивную регуляцию клеточной дифференциации ($n = 8$), и за регуляцию клеточной пролиферации ($n = 12$). Гипометилированные гены, выявленные в опухолевой ткани, относились к 2 группам: гены,

регулирующие миграцию клеток ($n = 2$), и гены, ответственные за фосфорилирование белков ($n = 3$).

При сравнении образцов с метастазами в регионарные лимфоузлы и образцов из контрольной группы из 1260 исследованных CpG-сайтов было выявлено 93 дифференциально метилированных CpG-сайта (7,3 %), из которых 64 (68,8 %) показали увеличение, а 29 (31,2 %) снижение уровня метилирования. В группе образцов с метастазами в регионарные лимфатические узлы гиперметилированные гены были представлены в 4 функциональных группах: регуляция адгезии клеток ($n = 2$), формирование анатомических структур, вовлеченных в морфогенез ($n = 2$), развитие кровеносных сосудов ($n = 2$), иммунный ответ ($n = 3$). Гипометилированные гены были представлены в двух группах: трансдукция сигналов ($n = 4$) и фосфорилирование белков ($n = 4$).

При сравнении исследованных групп по соотношению числа гиперметилированных и гипометилированных CpG-динуклеотидов было выявлено статистически значимое отличие злокачественных новообразований от доброкачественных ($OR = 3,82$; 95 % CI: 1,57-9,27; $p = 0,001$), обусловленное увеличением числа гиперметилированных CpG-сайтов в образцах с РМЖ. Также статистически значимое отличие наблюдалось и при сравнении образцов со злокачественными новообразованиями и метастазами в регионарные лимфоузлы ($OR = 1,73$; 95 % CI: 1,00-2,99; $p = 0,03$), которое было обусловлено увеличением числа гипометилированных CpG-сайтов в тканях регионарных лимфоузлов с метастазами. Между доброкачественными новообразованиями и метастазами в регионарные лимфатические узлы статистически значимых отличий по соотношению числа гипер- и гипометилированных CpG-сайтов не выявлено ($OR = 0,45$; 95 % CI: 0,17-1,20; $p = 0,06$).

В целом, число всех дифференциально метилированных генов в опухолевых тканях увеличивается по сравнению с группой образцов с доброкачественными новообразованиями ($p < 0,0001$). Однако при сравнении образцов с РМЖ и метастазами в РЛУ, напротив, наблюдается снижение числа дифференциально метилированных генов ($p < 0,0001$), что может указывать на общность эпигенетического профиля доброкачественных новообразований и метастазов в РЛУ. С целью проверки данного предположения был использован кластерный анализ. В результате была выявлена группа образцов с высокой степенью сходства по профилю метилирования ДНК, в которой представленность тканей с доброкачественными пролиферативными процессами и регионарными лимфогенными метастазами была статистически значимо выше, чем во всей выборке ($p < 0,001$) (рис. 2). Это означает что данный кластер, за исключением одного образца с РМЖ и одного образца с нормальным эпителием, состоит из образцов тканей молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами и регионарных лимфатических узлов с метастазами. Большинству других первичных опухолей и нормальных тканей был присущ другой спектр метилирования. В данных группах тканей профиль метилирования ДНК характеризовался

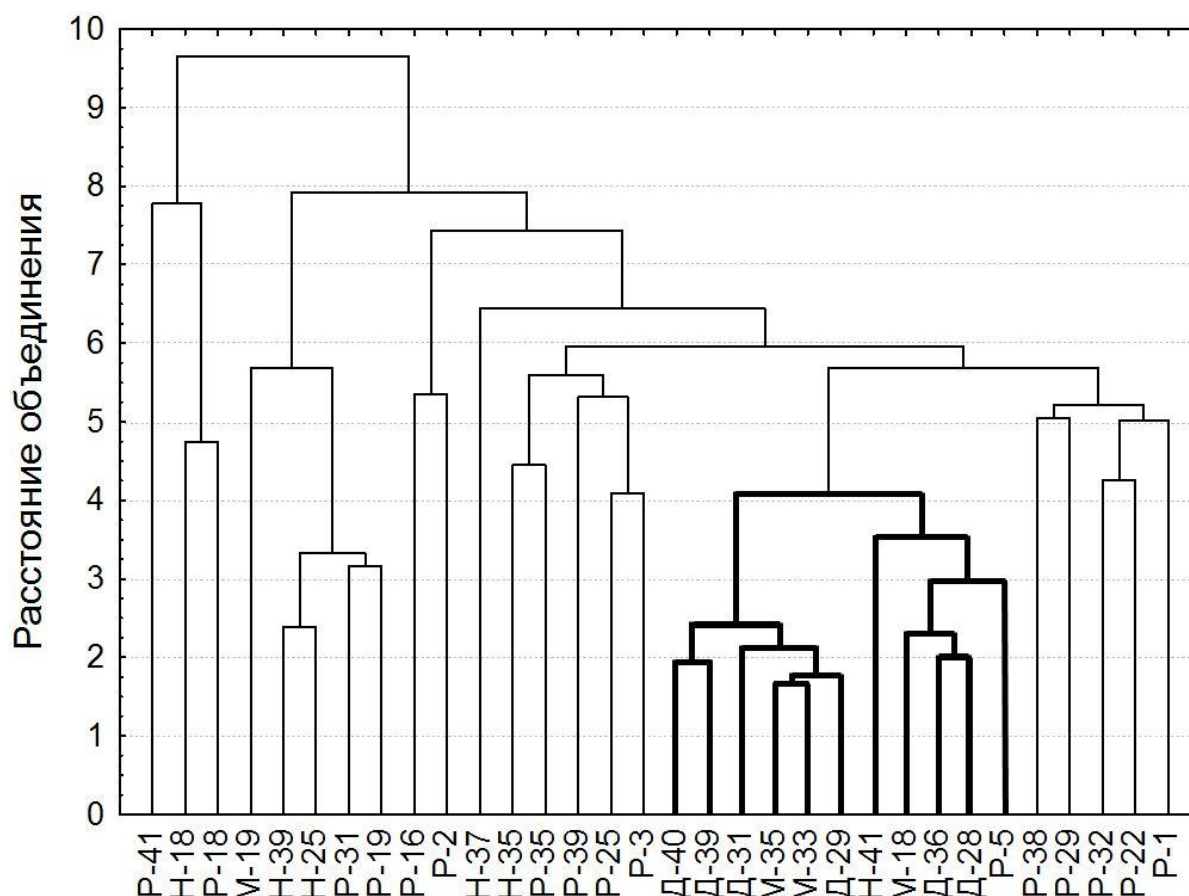


Рис. 2. Иерархическая кластеризация исследованных тканей по профилю метилирования ДНК. Р – образцы с раком молочной железы; Д – образцы с доброкачественными пролиферативными процессами; М – образцы с метастазами в регионарные лимфатические узлы; Н – образцы с гистологически нормальным эпителием молочной железы. Цифрами обозначены номера пациентов.

высокой гетерогенностью. Полученные результаты свидетельствуют о том, что группы тканей с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в регионарные лимфоузлы являются относительно близкими с точки зрения рисунка метилирования, хотя и являются разными по гистологической характеристике и локализации.

В результате анализа дифференциально метилированных генов, обусловивших разделение тканей при кластерном анализе, была выявлена всего лишь одна группа генов, которые по молекулярным функциям относились к рецепторам, связанным с G-белками (GPCR): *HTR1B*, *PTH1R*, *OPCML*, *MAS1*, *NPR2*, *FZD9*, *EDNRB*, *GPR116*, *GALR1*, *CCKAR*, *PDGFRB* и *EMR3* ($p = 0,023$). Для инициации многих клеточных процессов необходима внешняя стимуляция, и процессы, приводящие к злокачественной трансформации клетки, не являются исключением. Так, для запуска клеточной миграции и инвазии необходима стимуляция клетки такими факторами как матриксные металлопротеиназы, ростовые факторы, хемокины и др. Данные внеклеточные факторы взаимодействуют с рецепторами на поверхности раковых клеток, такими как интегрины,

рецепторы тирозин киназ и GPCR-белки (Kirui et al., 2010). При раке молочной железы показано изменение экспрессии GPCR и подавление белков, регулирующих G-сигнальные пути (Xie et al., 2009). Исследования нейтрофилов периферической крови и амебы *Dictyostelium discoideum* показали, что рецепторы, связанные с G-белками, играют важную роль в регуляции клеточной миграции, обусловленной градиентным хемотаксисом (Van Haastert, Devreotes, 2004). Миграция к хемоаттрактантам за счет реструктуризации цитоскелета показана и для клеток РМЖ (Yamazaki et al., 2005).

Оценка статуса метилирования генов контроля клеточного цикла RB1, p14ARF, CDKN2B. В результате анализа статуса метилирования ДНК с помощью микрочипа было выявлено, что в образцах с доброкачественными новообразованиями наблюдается гиперметилирование генов, регулирующих клеточный цикл. К тому же межгрупповое сравнение хромосомных аномалий показало, что хромосомные aberrации начинают накапливаться после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные. Данные находки свидетельствуют о том, что аномалии метилирования генов контроля клеточного цикла могут быть задействованы в развитии геномной нестабильности. Следовательно, необходимо более глубокое изучение данной группы генов. Аберрантное метилирование онкосупрессорных генов *p14ARF* и *CDKN2B* в проведенном нами исследовании было зарегистрировано с частотой 70,2 % и 13,5 %, соответственно, тогда как метилирования *RB1* отмечено не было. В большинстве случаев в исследованных образцах выявлялись и метилированные и неметилированные последовательности локусов. Наличие только метилированных аллелей было зарегистрировано в гене *p14ARF* в 13,5 % случаев.

В 9 из 37 образцов опухолевой ткани (24,3 %) промоторы всех 3 генов находились в неметилированном состоянии. В литературе обнаружены результаты единичных исследований, в которых одновременно оценивался статус метилирования данных генов при РМЖ. Что касается других типов опухолей, то частоты метилирования *RB1*, *p14ARF* и *CDKN2B* варьируют в широком диапазоне – от 5 до 83 % (Dong et al., 2005; Murao et al., 2006). Сравнительный анализ статуса метилирования *RB1*, *p14ARF* и *CDKN2B* в опухолевых тканях, полученных от пациенток с раком молочных желез, демонстрирует высокую частоту аномального метилирования *p14ARF* и *CDKN2B* при нормальном эпигенетическом статусе гена *RB1*. Анализ литературных данных, доступных в отношении других форм рака, свидетельствует о том, что, по крайней мере, при лимфомах и при эпидермальном раке, наблюдается аналогичная ситуация (табл. 2). Не исключено, что такая комбинация эпигенотипов исследованных генов, с одной стороны, может объясняться более высокой частотой метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ, по сравнению с геном *RB1*. С другой стороны, выявленная особенность может указывать на существование особых эпигенетических механизмов дизрегуляции клеточного цикла и поддержания стабильности генома при канцерогенезе, которые запускаются уже на уровне ингибиторов циклин-зависимых киназ.

Таблица 2

Комбинации статуса метилирования генов *p14ARF*, *CDKN2B* и *RB1*
при различных типах опухолей

	РМЖ	Лимфома	Эпидермальный рак
Всего образцов	37	22	20
Одновременное метилирование генов <i>CDKN2B</i> , <i>p14ARF</i> и <i>RB1</i>	0	0	0
Одновременное метилирование генов <i>p14ARF</i> и <i>RB1</i>	0	1 (4,5%)	1 (5%)
Одновременное метилирование генов <i>CDKN2B</i> и <i>RB1</i>	0	0	0
Одновременное метилирование генов <i>p14ARF</i> и <i>CDKN2B</i>	3 (8,1%)	6 (27,2%)	0
Метилирование только <i>p14ARF</i>	23 (62,1%)	6 (27,2%)	2 (10%)
Метилирование только <i>CDKN2B</i>	2 (5,4%)	2 (9%)	0
Метилирование только <i>RB1</i>	0	1 (4,5%)	0
Отсутствие метилирования всех трех генов	9 (24,3%)	6 (27,2%)	17 (85%)
Источник информации	Настоящее исследование	Linda et al., 2006	Murao et al., 2006

На частоту хромосомных аномалий могут влиять различные факторы, в том числе и нарушения функционирования генов регулирующих клеточный цикл. Поскольку в ходе настоящего исследования было выявлено, что нарушения RB-зависимого пути регуляции клеточного цикла могут быть обусловлены аномалиями метилирования генов *p14ARF* и *CDKN2B*, была изучена связь частоты хромосомных aberrаций со статусом метилирования данных генов. В тканях пациенток с РМЖ, у которых было выявлено метилирование гена *p14ARF*, среднее число хромосомных aberrаций составило $14,2 \pm 2,0$, в то время как в тканях без аномалий метилирования данного гена было выявлено в среднем $19,5 \pm 1,5$ хромосомных перестроек ($p = 0,46$). В опухолевых образцах с метилированием промоторной области гена *CDKN2B* среднее число хромосомных перестроек составило $8,0 \pm 1,0$, а в образцах без аномалий метилирования было выявлено $15,5 \pm 1,9$ хромосомных aberrаций ($p = 0,20$). Отсутствие статистически значимых различий по частоте хромосомных перестроек между образцами тканей с нормальным и aberrантным эпигенетическим статусом исследованных генов регуляции клеточного цикла указывает на то, что их гиперметилирование не оказывает существенного влияния на увеличение частоты хромосомных aberrаций при раке молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хромосомные аномалии и нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов являются одними из характерных признаков злокачественной трансформации клеток при раке молочной железы (Рубцов, Карамышева, 2000; Залетаев и др., 2004; Feinberg, 2010; Vlassov et al., 2010). Проведенное нами исследование было направлено на сравнительную цитогенетическую и эпигенетическую характеристику тканей молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами и злокачественными новообразованиями, а также тканей регионарных лимфатических узлов с метастазами с целью выявления особенностей динамики накопления различных мутационных событий в ходе развития онкологического процесса. Выбор данного направления исследования был обусловлен развитием представлений о роли хромосомных aberrаций и аномалий метилирования ДНК в индукции ранних этапов злокачественной трансформации клеток, а также противоречивостью имеющихся в литературе данных относительно значимости различных генетических механизмов в инициации нестабильности генома (Имянитов, 2010; Duesberg, 1999; Lotem, Sachs, 2002; Feinberg et al., 2006; Easton et al., 2007; Slattery et al., 2011).

В ходе первого этапа исследования с помощью сравнительной геномной гибридизации высокого разрешения были оценены спектр и частота несбалансированных хромосомных aberrаций в тканях с нормальным эпителием, доброкачественными и злокачественными новообразованиями, а также в тканях регионарных лимфатических узлов с метастазами. В результате во всех обследованных группах был выявлен широкий спектр хромосомных aberrаций. В группах с РМЖ и метастазами в РЛУ отмечалось значительное превалирование амплификаций над делециями, в то время как в группе образцов с доброкачественными пролиферативными процессами наблюдалась противоположная картина. Данная находка может быть объяснена с точки зрения гипотезы, свидетельствующей о значительной роли полиплоидизации клеток в развитии геномной нестабильности при злокачественных новообразованиях. Согласно данной гипотезе, полиплоидизация положительно влияет на развитие неоплазий, т.к. увеличивается выживаемость клеток с хромосомной нестабильностью за счет компенсации различных летальных мутаций (Storchova, Pellman, 2004; Merlo et al., 2010). Амплификация, по сути, является тем же самым увеличением генетического материала, только на ограниченных участках генома. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что в клонах клеток с признаками доброкачественных пролиферативных процессов, изначально превалировали делеции. Именно это явление могло лежать в основе того, что их геном был более стабилен по сравнению со злокачественными клонами, поскольку клоны клеток с доминированием делеций и высоким уровнем хромосомной нестабильности погибали вследствие возникновения различных летальных мутаций.

Кроме того, при внутрииндивидуальном сравнительном анализе общих хромосомных сегментов с аномалиями в разных тканях, было показано, что в тканях со злокачественными новообразованиями и метастазами в РЛУ число общих хромосомных перестроек значимо выше, чем в образцах с доброкаче-

ственными и злокачественными новообразованиями (OR = 2,98; 95 % CI: 1,36-6,70; $p = 0,002$). Этот факт может указывать на то, что вероятность возникновения хромосомных аномалий увеличивается после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные.

Далее нами был проведен анализ ассоциаций выявленных хромосомных аномалий с клиническими характеристиками больных РМЖ. Амплификации сегментов 1p31 и 1q24-q25 коррелировали с опухолями, соответствующими T₂₋₄ по TNM-классификации, т.е. были ассоциированы с большими размерами опухоли ($p = 0,022$ и $p = 0,028$, соответственно), в то время как у пациенток с делецией субсегмента 16q12.1 чаще наблюдались опухоли меньших размеров (T₁) по сравнению с больными без делеции ($p = 0,028$). Корреляция амплификации сегментов 1p31 и 1q24-q25 может указывать на то, что в данных сегментах локализованы онкогены, играющие значительную роль в накоплении клеточной массы. Что касается ассоциации делеции 16q12.1 с опухолями малых размеров, то в данном случае возникает вопрос о возможной протективной роли данной хромосомной аномалии в динамике развития злокачественного процесса. Протективный эффект может быть результатом наличия в данном регионе высокопенетрантного онкогена, делеция которого и обуславливает медленное накопление клеточной массы. Кандидатные гены с предполагаемыми онкогенными свойствами – *TNRC9* и *LOC643714*, локализованные в данном субсегменте, были выявлены в результате полногеномного ассоциативного исследования рака молочной железы (Easton et al., 2007).

В проведенном нами исследовании также были выявлены ассоциации амплификаций сегментов 1q42 и 1q43-q44 с сохраненным менструальным статусом ($p = 0,009$ и $p = 0,015$, соответственно). Обнаруженная связь, возможно, опосредована влиянием эстрогена на пролиферацию клеток. Эти данные говорят о том, что хромосомные aberrации играют значительную роль в процессах злокачественной трансформации эпителия молочной железы.

В результате анализа с помощью биологического микрочипа были получены профили метилирования 1260 CpG-сайтов, относящихся к 730 генам. Нами был проведен межгрупповой сравнительный анализ дифференциально метилированных генов. В группе доброкачественных новообразований дифференциально метилированными по отношению к контрольной группе оказались гены, регулирующие клеточную пролиферацию и мобильность клеток. В тканях со злокачественным фенотипом дифференциальное метилирование по сравнению с контрольной группой наблюдалось в генах, ответственных за клеточную дифференциацию и пролиферацию, а также за фосфорилирование белков и мобильность клеток. Полученные результаты являются ожидаемыми, так как изменение эпигенетического статуса выявленных генов обуславливает развитие характерных признаков злокачественных клеток. При сравнении доброкачественных и злокачественных новообразований выявлено, что образцы из группы с РМЖ характеризуются высоким уровнем эпигенетической нестабильности. При сравнении тканей молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами и тканей регионарных лимфоузлов с метастазами обна-

ружена высокая сходность образцов, входящих в данные группы. Исходя из вышеперечисленных данных можно предположить, что ткани с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в регионарные лимфоузлы характеризуются относительно низким уровнем эпигенетической нестабильности по сравнению с опухолевыми тканями. Кроме того, нами было обнаружено увеличение числа дифференциально метилированных CpG-сайтов в группе злокачественных новообразований по сравнению с доброкачественными ($p < 0,0001$), тогда как при сравнении опухолевых тканей с метастазами в регионарные лимфатические узлы, напротив, было выявлено уменьшение числа дифференциально метилированных локусов ($p < 0,0001$). Полученные данные указывают на возможную общность профиля метилирования ДНК в тканях с доброкачественными пролиферативными процессами и регионарных лимфатических узлах с метастазами.

С целью проверки данного предположения был проведен иерархический кластерный анализ. В результате был выявлен кластер образцов с высокой степенью сходства по профилю метилирования ДНК, в которой представленность тканей с доброкачественными пролиферативными процессами и регионарными лимфогенными метастазами оказалась статистически значимо выше, чем во всей остальной выборке ($p < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о том, что ткани с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в регионарные лимфоузлы являются относительно близкими с точки зрения рисунка метилирования ДНК, хотя и являются разными по гистологической характеристике и локализации.

Объяснить данный факт с позиций традиционной линейной гипотезы метастазирования (Fidler, Kripke, 1977) не представляется возможным, поскольку в этом случае должна была наблюдаться относительная общность профиля метилирования между группами с доброкачественными и злокачественными новообразованиями, а также между группами со злокачественными новообразованиями и метастазами. Если исходить из линейной гипотезы, то весь спектр дифференциально метилированных генов, выявленных при сравнении вышеперечисленных групп, должен наблюдаться при сравнении доброкачественных новообразований и метастазов, чего не было зарегистрировано в проведенном нами исследовании.

В то же время, полученные результаты находятся в хорошем соответствии с гипотезой параллельного метастазирования (Schmidt-Kittler et al., 2003), объясняющей возможность обособления клонов клеток с метастатическим потенциалом на начальных этапах злокачественной трансформации. Эта гипотеза уже нашла подтверждение на цитогенетическом (Klein, Hölzel, 2006) и экспрессионном (Ramaswamy et al., 2003) уровне. В проведенном нами исследовании впервые получено эпигенетическое свидетельство в пользу гипотезы параллельного метастазирования. Интересно, что отличие выделенного кластера тканей от всей остальной группы обследованных образцов было обусловлено дифференциальным метилированием всего одной группы генов, продукты ко-

торых являются рецепторами, связанными с G-белками, и существенными для миграционной активности клеток.

Обобщая результаты цитогенетического и эпигенетического разделов проведенного исследования, логично предположить, что на начальных стадиях канцерогенеза клетки-предшественники опухоли обладают фенотипом доброкачественного новообразования, однако уже имеют некоторое селективное преимущество перед окружающими нормальными тканями, что приводит к постепенному накоплению данного клона в органе. Это подтверждается экспериментальными данными. Так, например, показано существование вокруг первичной опухоли так называемых «полей канцеризации», являющихся гистологически нормальными тканями молочной железы, клетки которых имеют генетические нарушения, ассоциированные с раком (Braakhuis et al., 2003). В определенный момент времени (t_1) возникает субклон, у которого за счет какого-либо генетического и/или эпигенетического нарушения происходит инициация геномной нестабильности, что приводит к ускорению процессов малигнизации (рис. 3).

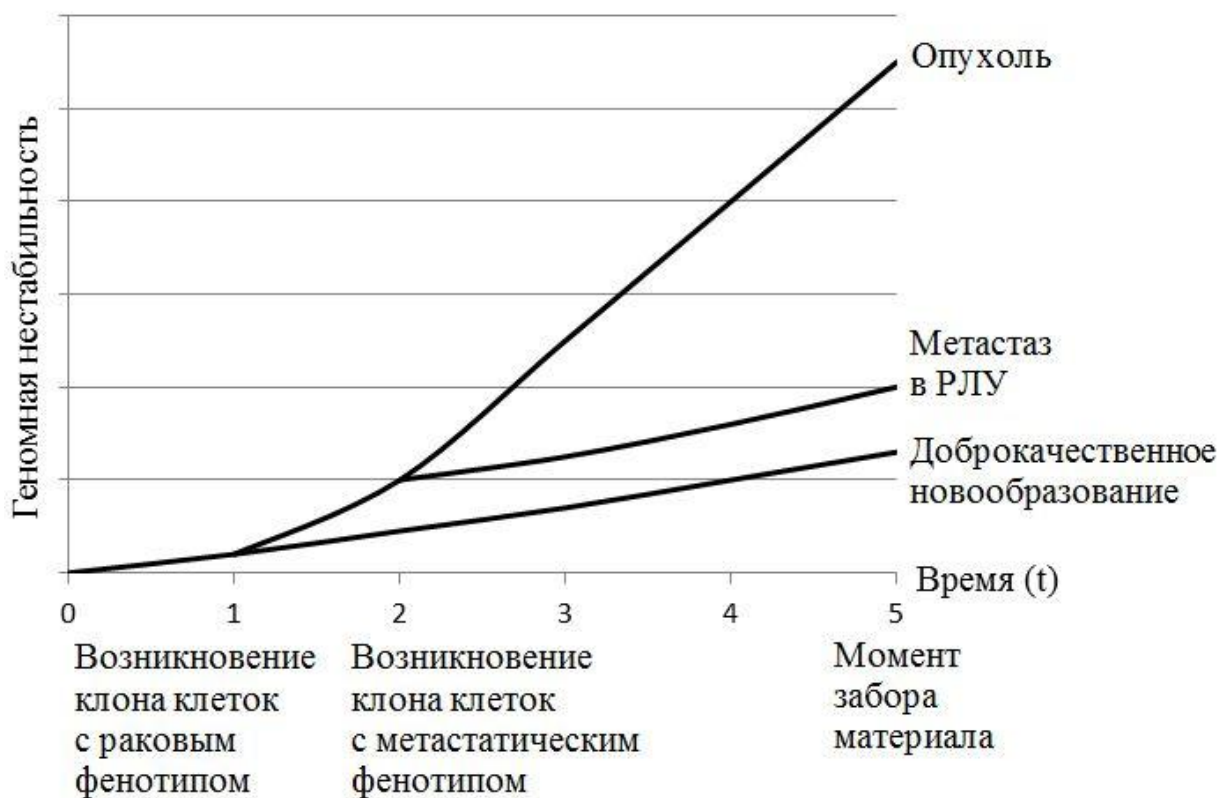


Рис. 3. Динамика развития геномной нестабильности при раке молочной железы.

Скорее всего, обособление клона клеток, ответственных за развитие метастазов в регионарные лимфатические узлы (t_2), происходит спустя относительно небольшой промежуток времени после возникновения клона злокачественных клеток. В пользу непродолжительности данного отрезка времени ($t_1 -$

t₂) свидетельствует тот факт, что рисунок метилирования ДНК тканей из группы с лимфогенными метастазами схож с рисунком метилирования в группе образцов с доброкачественными изменениями, т.е. обособление клоноклеток с метастатическим потенциалом происходит до кардинального изменения рисунка метилирования в первичном опухолевом узле вследствие различных абберантных эпигенетических модификаций.

Поскольку в результате анализа статуса метилирования ДНК с помощью микрочипа было выявлено, что в образцах с доброкачественными пролиферативными процессами наблюдается дифференциальное метилирование генов, регулирующих клеточный цикл, а в результате цитогенетического анализа показано, что хромосомные aberrации начинают накапливаться после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные, нами был проведен анализ эпигенетического статуса генов, регулирующих G1/S переход клеточного цикла (*RB1*, *p14ARF* и *CDKN2B*). Однако связи аномалий метилирования исследованных генов с частотой хромосомных aberrаций обнаружено не было.

В результате проведенных цитогенетических исследований было показано, что в образцах с РМЖ и метастазами в РЛУ число общих хромосомных перестроек значимо выше, чем в образцах с доброкачественными и злокачественными новообразованиями. Это может указывать на то, что вероятность возникновения хромосомных аномалий увеличивается после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные. Напротив, в результате анализа статуса метилирования было выявлено, что группы образцов с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами в регионарные лимфатические узлы являются относительно близкими с точки зрения рисунка метилирования ДНК. Это свидетельствует о том, что выявленные в данных группах аномалии метилирования образуются до деления клеточных клонов с доброкачественными пролиферативными процессами и метастазами.

Таким образом, полученные в результате проведенного молекулярно-цитогенетического и эпигенетического исследования данные позволяют сделать предположение о том, что эпигенетические аномалии являются первичными по отношению к хромосомным aberrациям при развитии геномной нестабильности при раке молочной железы. Основанием для такого предположения является тот факт, что аномалии метилирования, характерные для метастатических клонов, возникают еще в доброкачественных новообразованиях, тогда как большинство хромосомных перестроек, характерных для образцов с РМЖ и метастазами, образуются уже после перехода доброкачественных новообразований в злокачественные.

ВЫВОДЫ

1. В тканях молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами наблюдается превалирование делеций над амплификациями по сравнению со злокачественными новообразованиями (OR = 3,96; 95 % CI: 1,84-8,64; $p = 0,0001$) и метастазами в регионарные лимфатические узлы (OR = 10,61; 95 % CI: 3,78-30,67; $p < 0,0001$).

2. Число общих хромосомных сегментов, затронутых хромосомными абберациями, в опухолевых тканях и регионарных лимфатических узлах с метастазами статистически значимо выше, чем в тканях молочной железы с доброкачественными и злокачественными новообразованиями (OR = 2,98; 95 % CI 1,36-6,70; $p = 0,002$).
3. Амплификации сегментов 1p31 и 1q24-q25 при раке молочной железы статистически значимо чаще регистрируются в опухолях T₂-T₄ ($p = 0,022$ и $p = 0,028$, соответственно), тогда как делеция 16q12.1 – в опухолях T₁ по TNM-классификации ($p = 0,028$). У женщин с сохраненным менструальным статусом при раке молочной железы чаще выявляются амплификации сегментов 1q42 и 1q43-q44 по сравнению с пациентками, находящимися в менопаузе ($p = 0,009$ и $p = 0,015$, соответственно).
4. Число дифференциально метилированных CpG-сайтов в опухолевой ткани статистически значимо увеличивается по сравнению с группой образцов с доброкачественными новообразованиями ($p < 0,0001$) за счет усиления процессов гиперметилирования ДНК. В то же время, при сравнении образцов с РМЖ и метастазами в РЛУ наблюдается снижение числа дифференциально метилированных CpG-сайтов ($p < 0,0001$).
5. Впервые установлено, что у больных раком молочной железы ткани молочной железы с доброкачественными пролиферативными процессами и ткани регионарных лимфоузлов с метастазами являются относительно близкими по профилю метилирования ДНК. Отличие доброкачественных новообразований молочной железы и метастазов в регионарные лимфатические узлы от опухолевых тканей обусловлено дифференциальным метилированием генов, относящихся по молекулярным функциям к рецепторам, связанным с G-белками.
6. Метилирование промоторных регионов генов ингибиторов циклин-зависимых киназ (*p14ARF* и *CDKN2B*) является одним из механизмов эпигенетической инактивации ретинобластомного пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы, при этом зависимости уровня хромосомных аббераций от статуса метилирования генов *RB1*, *p14ARF* и *CDKN2B* не обнаруживается.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Скрябин Н.А.**, Лебедев И.Н., Толмачёва Е.Н., Чердынцева Н.В. Роль метилирования генов ингибиторов циклин-зависимых киназ в эпигенетической инактивации ретинобластомного пути регуляции клеточного цикла при раке молочной железы // Якутский медицинский журнал. 2009. Т. 26. № 2. С. 89-91.
2. **Скрябин Н.А.**, Лебедев И.Н., Черемных А.Д., Суханова Н.Н., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Анализ хромосомных нарушений при доброкачественных и злокачественных новообразованиях молочных желез с помощью сравнительной геномной гибридизации // Сибирский онкологический журнал. 2010. Т. 41. № 5. С. 22-26.

3. **Скрябин Н.А.**, Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н., Чердынцева Н.В. Эпигенетический аспект возможности раннего лимфогенного метастазирования при раке молочной железы // Вопросы онкологии. 2011. Т. 57. № 6. С. 717-721.
4. **Скрябин Н.А.**, Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Хромосомные аномалии как возможные прогностические маркеры при раке молочной железы // Генетика человека и патология: актуальные проблемы современной цитогенетики. Сборник научных трудов / Под ред. В.П. Пузырёва. Выпуск 9. Томск: «Печатная мануфактура». 2011. С. 126-131.
5. **Скрябин Н.А.**, Толмачёва Е.Н., Москвичёв И.И., Лебедев И.Н., Чердынцева Н.В. Взаимодействие хромосомных и эпигенетических нарушений при раке молочной железы // Опыт научно-технического и инновационного сотрудничества Томской области и Тайваня: Сборник материалов Сибирско-Тайваньского Форума: В 2 т. Томск, 16-17 сентября 2009 г. Т. 2. Томск: Томский государственный университет. 2009. С. 128-129.
6. **Скрябин Н.А.**, Черемных А.Д., Лебедев И.Н., Чердынцева Н.В. Цитогенетические маркеры рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2010. Т. 56. № 2. Приложение. С. 42.
7. **Скрябин Н.А.**, Черемных А.Д., Лебедев И.Н., Стахеева М.Н., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Сравнительная геномная гибридизация в диагностике хромосомных aberrаций при доброкачественных пролиферативных процессах и злокачественных новообразованиях молочной железы // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2010». Под редакцией В.И. Покровского. Москва. 2010. Т. 4. С. 123-125.
8. **Скрябин Н.А.**, Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Профиль метилирования ДНК при доброкачественных пролиферативных процессах и злокачественных новообразованиях молочной железы // Вопросы онкологии. Материалы VII Российской конференции по фундаментальной онкологии. 2011. № 2. Т. 57. С. 58-59.
9. **Скрябин Н.А.**, Лебедев И.Н., Чердынцева Н.В. Эпигенетический компонент возможности раннего лимфогенного метастазирования при раке молочной железы // Медицинская генетика. Материалы конференции «Актуальные проблемы онкогенетики». 2011. Т. 10 № 10. С. 21-22.
10. **Скрябин Н.А.**, Малиновская Е.А. Однородность профиля метилирования ДНК в тканях с доброкачественными пролиферативными процессами молочных желез и метастазами в регионарные лимфатические узлы // Сибирский онкологический журнал. 2011. Приложение 1. С. 106-107.
11. **Skryabin N.A.**, Lebedev I.N., Cherdyntseva N.V. Similarity of DNA methylation profile in tissues with benign breast disorders and lymph nodes metastasis in patients with breast cancer // European Journal of Human Genetics. 2011. V. 19. Suppl. 2. P. 239.