

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2021

УДК 595.599.9

Филиппова Е.А.¹, Бурденный А.М.¹, Лукина С.С.¹, Иванова Н.А.¹, Пронина И.В.¹, Казубская Т.П.², Брага Э.А.¹, Логинов В.И.¹

Изменение уровня метилирования группы генов микроРНК как фактора развития и прогрессии рака молочной железы

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 24

Введение. Метилирование как процесс эпигенетической регуляции экспрессии генов является важнейшим в поддержании геномной стабильности. В норме этот процесс определяет подавление активности онкогенов и поддержание работы супрессоров опухолевого роста. Другим важнейшим эпигенетическим регулятором являются микроРНК. Нарушения метилирования CpG-островков в промоторных районах генов, кодирующих микроРНК, являются важнейшим фактором онкогенеза. **Цель** – расширение спектра генов микроРНК гиперметилируемых при раке молочной железы и изучение их связи с метастазированием и иммуногистохимическим статусом опухоли.

Методика. В настоящей работе был проведен отбор ряда генов микроРНК, изменяющих уровень метилирования при раке молочной железы. Методом количественной метилспецифичной ПЦР на представительной выборке из 70 парных образцов рака молочной железы изучен уровень метилирования 8 генов микроРНК, ассоциированных с раком молочной железы: *MIR107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR191*, *MIR203A*, *MIR339*.

Результаты. Показано статистически значимое увеличение уровня метилирования в опухолевой ткани РМЖ по сравнению с гистологически нормальной тканью молочной железы для генов *MIR107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339* и снижение уровня метилирования для гена *MIR191*. Кроме того, показано статистически значимое увеличение уровня метилирования на III-IV (поздних) стадиях РМЖ для генов *MIR107*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339*, в опухолях с большим размером – *MIR107*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339*, с низким уровнем дифференцировки – *MIR124-2*, с наличием метастазов в лимфатические узлы – *MIR107*, *MIR1258*, *MIR137*, *MIR339*. Опухоли, не экспрессирующие рецептор прогестерона (PR), имеют статистически значимо более высокий уровень метилирования генов *MIR137*, *MIR339*.

Заключение. Таким образом, определены новые молекулярные показатели прогрессии РМЖ и биомаркеры, которые могут быть использованы при дифференциальной диагностике молекулярного подтипа РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; гены микроРНК; уровень метилирования

Для цитирования: Филиппова Е.А., Бурденный А.М., Лукина С.С., Иванова Н.А., Пронина И.В., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Изменение уровня метилирования группы генов микроРНК как фактора развития и прогрессии рака молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(3): 4-11.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.03.4-11

Участие авторов: концепция дизайна исследования – Бурденный А.М., Брага Э.А.; сбор материала – Казубская Т.П.; анализ и интерпретация данных – Лукина С.С., Иванова Н.А., Пронина И.В.; статистическая обработка данных – Филиппова Е.А.; подготовка иллюстративного материала – Логинов В.И.; написание текста – Филиппова Е.А., Бурденный А.М.; редактирование текста – Брага Э.А., Логинов В.И.; обсуждение окончательной версии статьи – Бурденный А.М., Логинов В.И.

Для корреспонденции: Бурденный Алексей Михайлович, e-mail: burdennyu@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-15-00126).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.04.2021

Принята к печати 30.06.2021

Опубликована 30.09.2021

Filippova E.A.¹, Burdenny A.M.¹, Lukina S.S.¹, Ivanova N.A.¹, Pronina I.V.¹, Kazubskaya T.P.², Braga E.A.¹, Loginov V.I.¹

Changes in the methylation level of microRNA genes as a factor of breast cancer development and progression

¹Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8 Baltiyskaya Str., Moscow, 125315, Russian Federation;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
24 Kashirskoe shosse, Moscow 115478, Russian Federation

Background. Methylation, as an epigenetic mechanism for regulation of gene expression, is crucial for the genome stability. Normally, this process is characterized by the ability to silence the oncogene activity and to support the action of suppressor genes. MicroRNAs (miRNAs) are another key epigenetic regulator of gene expression. Aberrant methylation of CpG islands in promoter regions of the genes that code miRNAs is the most important oncogenic factor. **Aim.** To expand the spectrum of miRNA genes hypermethylated in breast cancer and to study their relationship with metastasis and immunohistochemical status of the tumor. **Methods.** MiRNA tumor suppressor genes were selected that changed their methylation level in breast cancer patients. Using the method of quantitative methylation-specific PCR, the methylation level of eight miRNA genes associated with breast cancer was studied on a representative set of 70 paired breast cancer samples: *MIR107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR191*, *MIR203A*, and *MIR339*.

Results. The methylation level of the genes *MIR-107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339* was significantly higher in breast cancer tissue compared to normal breast tissue whereas for the gene *MIR191*, it was significantly lower. Also, the methylation levels of genes *MIR107*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, and *MIR339* were significantly increased at stages III-IV (advanced) breast cancer; in large tumors, the methylation levels were increased for *MIR107*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, and *MIR339*; in poorly differentiated tumors, the methylation level was increased for *MIR124-2*; and in the presence of lymph node metastases, for *MIR107*, *MIR1258*, *MIR-137*, and *MIR-339*. Tumors not expressing the progesterone receptor (PR) had a higher methylation level of *MIR137* and *MIR339*.

Conclusion. The study determined new molecular indicators for breast cancer progression and identified biomarkers that may be used in the differential diagnosis of breast cancer molecular subtype.

Keywords: breast cancer; microRNA genes; methylation level

For citation: Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Ivanova N.A., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I. Changes in the methylation level of microRNA genes as a factor of breast cancer development and progression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65 (3): 4-11. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.03.4-11

Contribution: concept design of the study – Burdenny A.M., Braga E.A.; collection of material – Kazubskaya T.P.; analysis and interpretation of data – Lukina S.S., Ivanova N.A., Pronina I.V.; statistical data processing – Filippova E.A.; preparation of illustrative material – Loginov V.I.; writing of the text – Filippova E.A., Burdenny – A.M.; editing of the text – Braga E.A., Loginov V.I.; discussion of the article final version – Burdenny A.M., Loginov V.I.

For correspondence: *Burdenny Alexey Mikhailovich*, leading researcher of the lab. Pathogenomics and transcriptomics, Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: burdenny@gmail.com

Financing. The work was carried out at the expense of the Russian Science Foundation (grant No. 20-15-00126).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Braga E.A., <https://orcid.org/000-0001-5188-4094>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Received: 17.04.2021

Accepted: 30.06.2021

Published: 30.09.2021

Введение

На сегодняшний день рак молочной железы (PMЖ) остается наиболее распространенным видом рака у женщин как в развитых, так и в развивающихся странах [1]. Каждый год в мире регистрируется более 1,5 млн случаев PMЖ. В России этот показатель

находится на уровне выявления более 50000 новых случаев этого заболевания [1, 2]. Среди пациенток с онкологическими заболеваниями PMЖ считается основной причиной неблагоприятного исхода [3]. При этом специфических маркеров для прогноза и лечения за-

болевания по результатам транскриптомного и протеомного анализов пока не выявлено [4].

Важным эпигенетическим механизмом регуляции экспрессии генов является метилирование CpG-островков их промоторных районов. При РМЖ наблюдается изменение характера метилирования как белок-кодирующих генов, так и генов некодирующих белки, в том числе и генов микроРНК [5]. Показано, что гены микроРНК в несколько раз чаще подвергаются метилированию, чем белок-кодирующие гены [6, 7]. Также было показано, что многие микроРНК вовлечены в патогенез эпителиальных опухолей разной локализации, в том числе, и в процессы инвазии, эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования, протекающие при РМЖ [8]. Согласно гипотезе Hanahan & Weinberg, прогрессия заболевания и метастатическая активность опухолевых клеток определяется генами, в которых изменения накапливаются на последней стадии заболевания и коррелируют со степенью злокачественности опухоли [9]. В ряде работ показан высокий уровень метилирования для пациенток с прогрессией РМЖ [10-12]. Следует отметить, что ранее для генов микроРНК (*MIR124-2*, *MIR137*, *MIR191*, *MIR203A*; *MIR107*, *MIR1258*, *MIR130B*), нами была показана роль изменения уровня метилирования их промоторных CpG-островков в прогрессии рака различных локализаций [17, 19]. Поскольку процессы, приводящие к возникновению опухолей, имеют некоторые схожие черты патологического развития, мы решили изучить возможное участие изменения уровня метилирования исследованных ранее генов микроРНК в патогенезе РМЖ.

Цель работы – изучение изменения уровня метилирования спектра генов микроРНК, гиперметилируемых при раке молочной железы, и их связи с метастазированием и иммуногистохимическим статусом опухоли.

Методика

Образцы РМЖ собраны и морфологически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследованы образцы РМЖ и парные гистологически неизменённые ткани молочной железы, полученные от 70 пациенток, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Все опухоли молочной железы классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [13]. В **таблице** приведены обобщенные данные по клинико-гистологическим характеристикам исследованных 70 парных образцов РМЖ. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70-80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3-5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. В качестве второго (абсолютного) контроля использовали 17 образцов тканей молочной железы лиц, умерших от заболеваний не связанных с онкологией и не имевших онкологических заболеваний в анамнезе. Работа выполнена по международным правилам работы с биоматериалом людей. Получено разрешение локального этического комитета.

Образцы тканей хранили при -70 °С. Полученные в ходе биопсии или оперативного вмешательства образцы объемом до 100 мм³ измельчали с использованием гомогенизатора-диспергатора Ultra-Turrax T10 basic, (IKA, Германия). Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани по стандартной методике с применением фенол-хлороформной экстракции. Качество и концентрацию ДНК определяли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific», США).

Уровень метилирования генов микроРНК анализировали методом количественной метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени с применением бисульфитной конверсии ДНК (0.5–2.0 мкг) по методу опубликованному в работах [14-16]. Набор реактивов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США) по протоколу производителя. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для исследованных генов микроРНК взяты из работ [14, 17, 18] Полноту конверсии ДНК определяли с помощью контрольного локуса гена *ACTB* с использованием олигонуклеотидов специфичных к неконвертированной матрице [14]. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 («Promega», США). В качестве положительного контроля 100%-ого метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 («Thermo Fisher Scientific»).

Статистическую оценку полученных данных по изменению уровня метилирования генов микроРНК проводили с применением показателя индекса метили-

рования (ИМ), рассчитанного для каждого образца. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрические критерии Манна-Уитни и Краскала-Уоллиса для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных IBM SPSS Statistics 22.

Результаты исследования

На представительной выборке из 70 парных образцов РМЖ (опухоль/гистологически неизменная норма) и 17 контрольных образцах проведено сравнение уровня метилирования 8 исследованных генов микроРНК (*MIR107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR203A*, *MIR339*, *MIR191*). Статистически значимого изменения уровня метилирования исследованных

генов в образцах гистологически неизменной прилежащей ткани молочной железы относительно уровня метилирования их же в контрольных образцах выявлено не было.

С использованием критерия Краскала-Уоллиса для 3 независимых выборок статистически значимое увеличение уровня метилирования в образцах опухоли по сравнению с парными образцами гистологически неизменной прилежащей ткани молочной железы и контрольной группы было выявлено для 4 генов микроРНК (*MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339* – $p < 0,002$) и значимое снижение уровня метилирования в опухоли по сравнению с нормальной тканью и контрольной группой для *MIR-191* ($p < 0,0001$) (рис. 1). Кроме этого, с использованием критерия Манна-Уитни, выявлено значимое увеличение уровня метилирования гена

Таблица/Table

Клинико-патологические параметры больных РМЖ

Clinical and pathological breast cancer patients features

Клинико-патологический параметр		N=70 (%)
Гистологический тип	Инфильтративно-протоковый рак	49 (70)
	Инфильтративно-дольковый рак	21 (30)
Стадия опухолевого процесс	I	9 (12.9)
	II	37 (52.9)
	III	23 (32.9)
	IV	1 (1.4)
Степень дифференцировки	G1	6 (8.6)
	G2	51 (72.9)
	G3	13 (18.6)
Размер первичной опухоли	T1	13 (18.6)
	T2	43 (61.4)
	T3	8 (11.4)
	T4	6 (8.6)
Лимфогенное метастазирование	N0	28 (40)
	N1-3	42 (60)
Иммуно-гистохимический тип опухоли	Люминальный тип А	9 (12.9)
	Люминальный тип В (HER2/neu ⁻ , Ki-67>16%)	12 (17.1)
	Люминальный тип В(HER2/neu ⁺)	34 (48.6)
	Erb-B2	7 (10)
Тройной-негативный рак	8 (11.4)	
Статус рецепторов эстрогенов	Положительный	53 (75.7)
	Отрицательный	17 (24.3)
Статус рецепторов прогестерона	Положительный	40 (57.1)
	Отрицательный	30 (42.9)
Статус HER2	Положительный	41 (58.6)
	Отрицательный	29 (41.4)
Статус Ki67	низкий, <16%	19 (27.1)
	промежуточный, 16-30%	23 (32.9)
	высокий, >30%	28 (40)

MIR124-2 относительно уровня метилирования в контрольной группе ($p < 0,05$) и гена *MIR107* относительно парных образцов гистологически неизменённой прилежащей ткани молочной железы ($p = 0,002$). Для *MIR203A* изменения уровня метилирования при РМЖ не выявлено. Полученные результаты подтверждают более ранние исследования, выполненные на меньших выборках образцов РМЖ, о роли метилирования этих генов микроРНК в патогенезе РМЖ [11].

Далее мы провели сравнение полученных данных об изменении уровня метилирования исследованных генов микроРНК с клинико-морфологическими характеристиками опухолей (стадией, степенью дифференцировки, размером опухоли, наличием

или отсутствием метастазов в лимфатических узлах). С использованием критерия Манна-Уитни для независимых выборок, было выявлено статистически значимое ($p < 0.02$) увеличение уровня метилирования на III-IV стадии по сравнению с I-II стадией для пяти исследованных генов микроРНК: *MIR107*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339* (рис. 2, А). Следует подчеркнуть, что в зарубежной литературе информация о связи исследованных генов со стадией онкологического процесса при раке молочной железы, не выявлена. Выявлено значимое увеличение уровня метилирования для *MIR124-2* в образцах с низкой степенью дифференцировки опухоли и неблагоприятным прогнозом (G3 – низкодифференци-

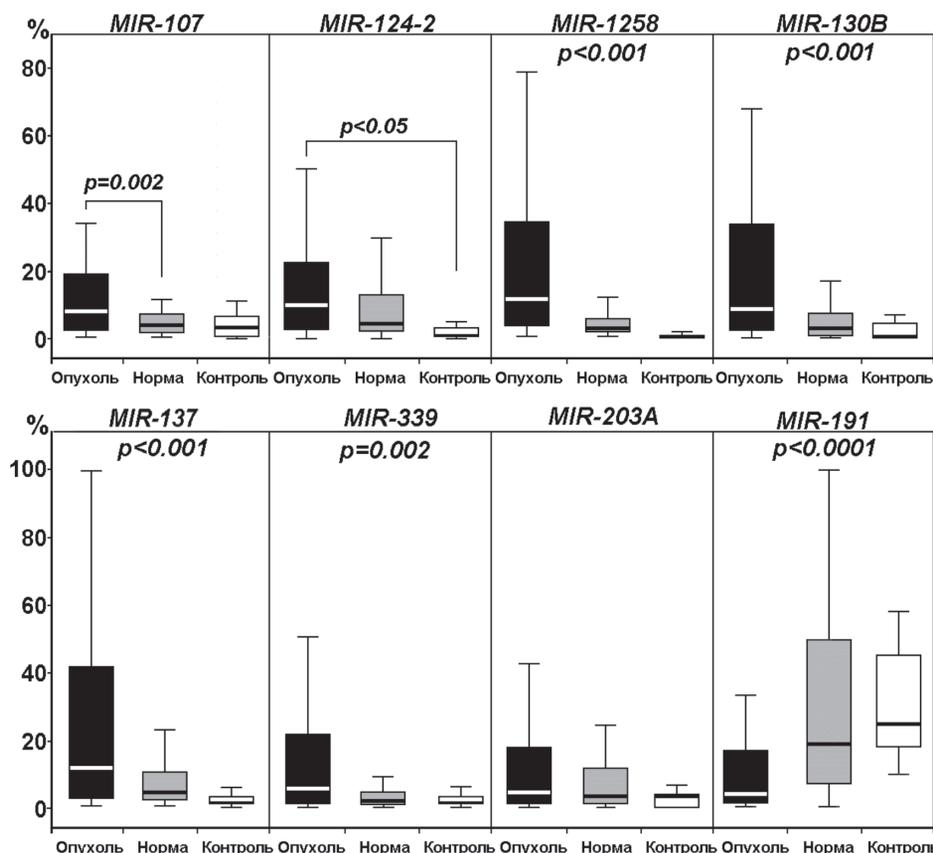


Рис. 1. Сравнение уровня метилирования 8 генов миРНК в образцах опухоли РМЖ, парной гистологически неизменённой ткани и нормальной ткани умерших без онкопатологии в анамнезе («контроль»). Верхняя и нижняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют третьему и первому квартилям (внутри прямоугольника попадает 50% наблюдений). Линия внутри прямоугольника представляет медиану. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечены максимальное и минимальное значения. Ось Y – уровень метилирования в процентах; ось X – анализируемые группы.

Fig. 1. Comparison of the 8 miRNA genes methylation level in breast cancer samples with paired histologically unchanged tissue and normal tissue of deceased patients without a history of cancer pathology («control»). The upper and lower borders of the rectangles in the diagrams correspond to the third and first quartiles (50% of the observations fall inside the rectangle). The line inside the rectangle represents the median. The lines at the top and bottom of the rectangles indicate the maximum and minimum values. Y-axis – the level of methylation (percentage); X-axis – the analyzed groups.

рованная опухоль) ($p=0.015$, рис. 2, Б). Кроме того, для генов *MIR107*, *MIR1258*, *MIR339* выявлено значимое ($p<0,05$) увеличение уровня метилирования как в образцах с большим (T3 - опухоль более 5 см в наибольшем измерении) размером опухоли, так и в образцах с наличием метастазов в лимфатических узлах (N_{1-3}) (рис. 2, В, Г). Следует отметить, что выявление связи гиперметилирования гена *MIR1258* с метастазированием соответствует результатам, полученным при раке легкого [19].

Важно отметить, что для гена *MIR130B* обнаружено статистически значимое увеличение уровня ме-

тилирования только в образцах с большим размером опухоли ($p=0.004$), а для *MIR137* – только в образцах с наличием метастазов в лимфатических узлах ($p=0,016$). Нам известно единственное сообщение, в котором повышение частоты метилирования гена *MIR-137* при РМЖ показано с помощью гибридизации ДНК на чипах [20].

Таким образом, полученные нами результаты расширяют представления о роли исследованных микроРНК в патогенезе РМЖ. Важно отметить, что 3 микроРНК *MIR107*, *MIR1258*, *MIR339* коррелируют со всеми исследованными патофизиологическими параметрами

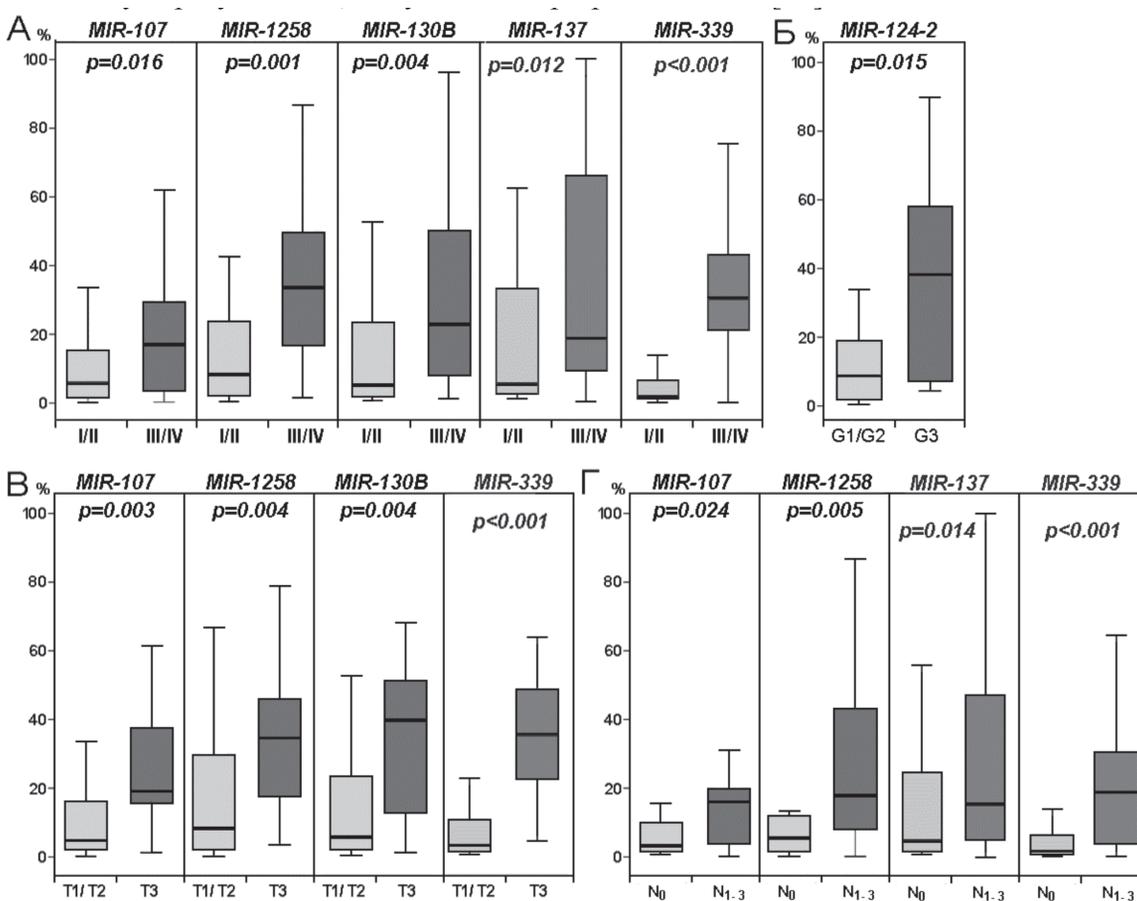


Рис. 2. Связь уровня метилирования генов миРНК со стадией онкологического процесса (А), степенью дифференцировки (Б), размером опухоли (В), наличием метастазов в лимфатические узлы или другие органы (Г) при РМЖ. Верхняя и нижняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют третьему и первому квартилям (внутри прямоугольника попадает 50% наблюдений). Линия внутри прямоугольника представляет медиану. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечены максимальное и минимальное значения. Ось Y – уровень метилирования в процентах; ось X – анализируемые группы.

Fig. 2. The relationship of the miRNA genes methylation level with the stage of the oncological process (A), the degree of differentiation (B), the size of the tumor (C), the presence of metastases to the lymph nodes or other organs (D) in breast cancer. The upper and lower borders of the rectangles in the diagrams correspond to the third and first quartiles (50% of the observations fall inside the rectangle). The line inside the rectangle represents the median. The lines at the top and bottom of the rectangles indicate the maximum and minimum values. Y-axis – the level of methylation (percentage); X-axis – the analyzed groups.

прогрессии РМЖ. Это может указывать на диагностический и прогностический потенциал этих генов.

Итоговой частью нашей работы стало сопоставление полученных нами результатов по уровню метилированию исследованных генов микроРНК с иммуно-гистохимическим типом опухоли, статусом рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста 2 типа (Her2/neu), и уровнем экспрессии антигена Ki-67. Для *MIR107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR203A*, *MIR191* статистически значимых изменений уровня метилирования при РМЖ выявлено не было. Показано статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *MIR137* и *MIR339* в опухолях молочной железы, не экспрессирующих прогестероновый рецептор (PR) (рис 3).

Таким образом, полученные данные о высоком уровне метилирования генов *MIR137* и *MIR339* в образцах с отсутствием экспрессии рецептора прогесте-

рона может рассматриваться как селективный биомаркер прогрессии РМЖ при анализе иммуногистохимического статуса опухоли.

Заключение

Таким образом, было изучено влияние aberrантного метилирования 8 генов микроРНК на патогенез РМЖ. Было установлено изменение уровня метилирования для семи из восьми генов. Было показано повышение уровня метилирования для 6 генов микроРНК в опухоли (*MIR107*, *MIR124-2*, *MIR1258*, *MIR130B*, *MIR137*, *MIR339*), что предположительно указывает на их супрессорную природу. Также показано выраженное гипометилирование гена *MIR191*, что может указывать на онкогенную природу данной микроРНК при РМЖ.

Показана статистически значимая корреляция повышенного уровня метилирования *MIR339* со стадией онкологического процесса, размером опухоли, наличием лимфогенных метастазов и уровнем экспрессии рецептора прогестерона. Это свидетельствует о том, что данная микроРНК может рассматриваться как один из биомаркеров опухоли молочной железы.

Авторы выражают благодарность РОНЦ им. Н.Н. Блохина за сбор и клинико-гистологическую характеристику образцов РМЖ.

Литература

(п.п. 1; 3-5; 7-17; 20 см. References)

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравоохранения России.
- Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия*. 2015; 80(2): 184-203.
- Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Хоконова В.В., Куревлев С.В., Казубская Т.П. и др. Новые гены микроРНК, гиперметилированные при раке молочной железы. *Молекулярная биология*. 2016; 50(5): 797-802. <https://doi.org/10.7868/S0026898416050104>
- Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. *Генетика*. 2013; 49(7): 896-901. <https://doi.org/10.7868/S0016675813070114>

References

- Rivera-Franco M.M., Leon-Rodriguez E. Delays in Breast Cancer Detection and Treatment in Developing Countries. *Breast Cancer (Auckl)*. 2018; 12: e1178223417752677. <https://doi.org/10.1177/1178223417752677>
- Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shahzadova A.O. Conditions of oncological care for the Russian population in 2019. [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2019 godu]. Moscow: FSBI P.A. Herzen MNROI of Ministry of Health and Social Development of Russia. (in Russian)

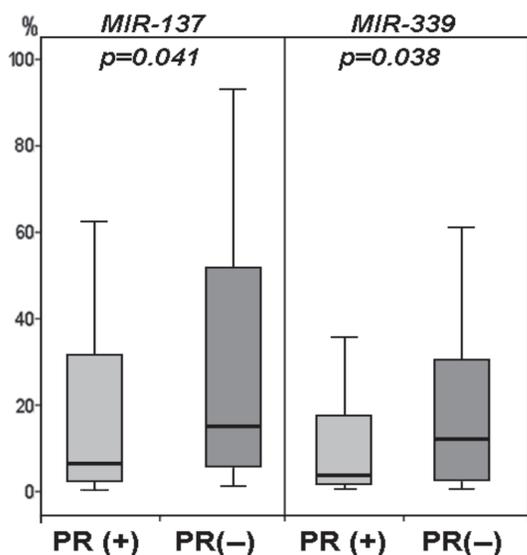


Рис. 3. Связь уровня метилирования генов микроРНК с наличием (PR(+)) или отсутствием (PR(-)) экспрессии рецепторов к прогестерону. Верхняя и нижняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют третьему и первому квартилям (внутри прямоугольника попадает 50% наблюдений). Линия внутри прямоугольника представляет медиану. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечены максимальное и минимальное значения. Ось Y – уровень метилирования в процентах; ось X – анализируемые группы.

Fig. 3. The relationship of the miRNA genes methylation level with the presence (PR (+)) or absence (PR (-)) of progesterone receptor expression. The upper and lower borders of the rectangles in the diagrams correspond to the third and first quartiles (50% of the observations fall inside the rectangle). The line inside the rectangle represents the median. The lines at the top and bottom of the rectangles indicate the maximum and minimum values. Y-axis – the level of methylation (percentage); X-axis – the analyzed groups.

3. Rocco N., Rispoli C., Moja L., Amato B., Iannone L., Testa S., et al. Different types of implants for reconstructive breast surgery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 2016(5): CD010895. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010895.pub2>
4. Zhang M., Wang Y., Wang Y., Jiang L., Li X., Gao H., et al. Integrative Analysis of DNA Methylation and Gene Expression to Determine Specific Diagnostic Biomarkers and Prognostic Biomarkers of Breast Cancer. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: e529386. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.529386>
5. Moarii M., Boeva V., Vert J.P., Reyat F. Changes in correlation between promoter methylation and gene expression in cancer. *BMC Genomics.* 2015; 16: e873. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1994-2>
6. Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. MicroRNA gene methylation and oncogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2015; 80(2): 145-62. <https://doi.org/10.1134/S0006297915020029>
7. Lo P.K., Wolfson B., Zhou X., Duru N., Gernapudi R., Zhou Q. Noncoding RNAs in breast cancer. *Brief Funct Genomics.* 2016; 15(3): 200-21. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elv055>
8. Arif K.M.T., Elliott E.K., Haupt L.M., Griffiths L.R. Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers (Basel).* 2020; 12(10): e2922. <https://doi.org/10.3390/cancers12102922>
9. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
10. Kang H., Kim C., Lee H., Rho J.G., Seo J.W., Nam J.W., et al. Downregulation of microRNA-362-3p and microRNA-329 promotes tumor progression in human breast cancer. *Cell Death Differ.* 2016; 23(3): 484-95. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.116>
11. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P. et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene.* 2017; 604: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.018>
12. Humphries B., Wang Z., Yang C. MicroRNA Regulation of Epigenetic Modifiers in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019; 11(7): 897. <https://doi.org/10.3390/cancers11070897>
13. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind Ch., eds. *Union for International Cancer Control (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th edn. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2017.
14. Hattermann K., Mehdorn H.M., Mentlein R., Schultka S., Held-Feindt J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Analytical Biochemistry.* 2008; 377(1): 62-71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.03.014>
15. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Kudryavtseva A.V., et al. Tumor suppressor function of the SEM-A3B gene in human lung and renal cancers. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0123369. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0123369>
16. Panagopoulou M., Karagiani M., Balgouranidou I., Bizzioti E., Koukaki T., Karamitrousis E., et al. Circulating cell-free DNA in breast cancer: size profiling, levels, and methylation patterns lead to prognostic and predictive classifiers. *Oncogene.* 2019; 38(18): 3387-401. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0660-y>
17. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdenny A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., et al. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene.* 2018; 662: 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.005>
18. Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V., Khokonova V.V., Kurelev S.V., Kazubskaya T.P., et al. Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer. *Molekulyarnaya biologiya.* 2016; 50(5): 705-9. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0026893316050101>
19. Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V., Kazubskaya T.P., Loginov V.I., Braga E.A. Novel miRNA genes methylated in lung tumors. *Genetika.* 2013; 49(7): 782-6. <https://doi.org/10.1134/S1022795413070119>
20. Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8(1): e54398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054398>

Сведения об авторах:

Филиппова Е.А., канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;
Бурденный А.М., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;
Лукина С.С., старший лаборант лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;
Иванова Н.А., мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;
Пronina И.В., канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;
Казубская Т.П., доктор мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Брага Э.А., доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;
Логинов В.И., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП.