

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Губенко М.С.<sup>1</sup>, Логинов В.И.<sup>1</sup>, Бурденный А.М.<sup>1</sup>, Пронина И.В.<sup>1</sup>, Филиппова Е.А.<sup>1</sup>, Казубская Т.П.<sup>2</sup>, Перцов С.С.<sup>3</sup>

# Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов системы апоптоза при немелкоклеточном раке легкого

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

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

115522, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина»,

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

**Актуальность.** Рак легкого – наиболее распространенное злокачественное новообразование во всем мире: в 2020 г. было диагностировано более 2,2 млн новых случаев, с высокой частотой неблагоприятного исхода – более 1,7 млн случаев. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет примерно 85% всех случаев рака легкого. Важную роль в патогенезе этого вида рака играет aberrантное метилирование CpG-островков промоторных областей в генах, ассоциированных с апоптозом. Ранее имелись сообщения о гиперметилировании генов *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2* в некоторых видах опухолей, но данные о роли метилирования этих генов в прогрессии НМРЛ представлены единичными сообщениями. Вопрос о роли метилирования промоторных CpG-островков в регуляции активности генов *BIM*, *BAX* и патогенезе НМРЛ до настоящего момента не выяснен. **Цель** – исследование изменений уровня экспрессии и метилирования генов системы апоптоза при НМРЛ.

**Методика.** Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня метилирования проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Анализ уровня экспрессии проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR-Green I. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок.

**Результаты.** С применением ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ( $p < 0.05$ ) увеличение уровня метилирования генов *BAX*, *DAPK1* и *BIM* и снижение для гена *BCL2* в образцах опухолей по сравнению с парной гистологически нормальной тканью легкого. Показано, что в исследованных первичных опухолях уровни метилирования генов *BAX*, *BIM* и *BCL2* статистически значимо ассоциированы с уровнями их экспрессии у больных с НМРЛ. Нами впервые показано увеличение уровня метилирования гена *BAX* при одновременном снижении его экспрессии в образцах опухоли с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с образцами опухоли без оных ( $p = 0.033$ ,  $FDR = 0.05$  и  $p < 0.01$ ,  $FDR = 0.05$ , соответственно).

**Заключение.** Обнаруженные нами новые закономерности представляют интерес для понимания механизмов развития НМРЛ, могут стать основой диагностики и прогноза течения этого заболевания, а также помочь в корректировании хода лечения с учетом патофизиологических особенностей опухоли.

**Ключевые слова:** метилирование; экспрессия; апоптоз; НМРЛ

**Для цитирования:** Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов системы апоптоза при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 5-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.5-12

**Участие авторов:** обработка материала, проведение исследования – Губенко М.С.; концепция и дизайн исследования, подготовка иллюстративного материала, редактирование статьи – Логинов В.И.; написание и редактирование статьи, дизайн таблиц – Бурденный А.М.; проведение исследования по экспрессии – Пронина И.В.; статистическая обработка результатов – Филиппова Е.А.; сбор и описание материала – Казубская Т.П.; общее руководство исследованием – Перцов В.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

**Финансирование.** Работа выполнена за счет средств государственного задания №FGFU-2022-0007.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.07.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Gubenko M.S.<sup>1</sup>, Loginov V.I.<sup>1</sup>, Burdenny A.M.<sup>1</sup>, Pronina I.V.<sup>1</sup>, Filippova E.A.<sup>1</sup>, Kazubskaya T.P.<sup>2</sup>, Pertsov S.S.<sup>3</sup>**DNA methylation in regulation of the apoptosis gene expression in non-small cell lung cancer**<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;<sup>2</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology,  
Kashirskoe shosse, 23, Moscow, 115522, Russian Federation;<sup>3</sup>Anokhin Research Institute of Normal Physiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation

**Background.** Lung cancer is the most common malignant neoplasm worldwide: in 2020 more than 2.2 million new cases and more than 1.7 million cases with a high frequency of adverse outcome were diagnosed. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 85% of all lung cancers. An important role in the pathogenesis of this type of cancer is played by aberrant methylation of CpG islands of promoter regions in apoptosis-related genes. Previous studies have reported hypermethylation of the DAPK1, APAF1, and BCL2 genes in some types of tumors, but reports of the role of methylation of these genes in the progression of NSCLC are scarce. The role of the promoter CpG islands methylation in the regulation of BIM, BAX gene activity and in the pathogenesis of NSCLC has not yet been clarified. **Aim.** To study changes in the expression and methylation levels of apoptosis-related genes in NSCLC. **Methods.** Samples of NSCLC tumors were collected and clinically characterized at the Blokhin Research Institute of Clinical Oncology. High-molecular DNA was isolated from the tissue by the standard method. The methylation level was analyzed using bisulfite DNA conversion and quantitative methylation-specific PCR (MS-PCR) with real-time detection. The expression level was measured by real-time PCR using the intercalating dye SYBR-Green I. The nonparametric Mann-Whitney criterion for independent samples was used to assess the significance of differences between the study groups.

**Results.** Real-time PCR detected a significant ( $p < 0.05$ ) increase in the methylation level of the BAX, DAPK1, and BIM genes and a decrease in the BCL2 gene in tumor samples compared to matched, histologically normal lung tissue. In the studied primary tumors, the methylation levels of the BAX, BIM and BCL2 genes were significantly associated with respective expression levels in patients with NSCLC. For the first time, this study demonstrated an increased methylation level of the BAX gene with a simultaneous decrease in its expression in tumor samples in the presence of lymph node metastases compared to tumor samples without metastases ( $p = 0.033$ , FDR=0.05 and  $p < 0.01$ , FDR=0.05, respectively).

**Conclusion.** Thus, the discovered new patterns are of interest for understanding the mechanisms of NSCLC development, can form a basis for diagnosis and prognosis of the course of this disease, and also help adjusting the management considering the pathophysiological features of the tumor.

**Keywords:** methylation; expression; apoptosis; NSCLC**For correspondence:** *Alexey M. Burdenny*, Candidate of Biological Sciences, L.S.S. lab. Pathogenomics and Transcriptomics of FSBSI NIIOPP, e-mail: burdenny@gmail.com**For citation:** Gubenko M.S., Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Pertsov S.S. DNA methylation in regulation of the apoptosis gene expression in non-small cell lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 5-12. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.5-12

**Authors' contribution:** processing of material, conducting research – Gubenko M.S.; concept and design of research, preparation of illustrative material, editing of the article – Loginov V.I.; writing and editing of the article, table design – Burdenny A.M.; conducting research on expression – Pronina I.V.; statistical processing of the result – Filippova E.A.; collection and the description of the material – Kazubskaya T.P.; general guidance of the study – Pertsov V.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**Information about the authors:**Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>**Financing.** The work was carried out at the expense of the state task No. FGFU-2022-0007.**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 15.07.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

## Введение

Несмотря на последние достижения в области профилактики, выявления и лечения рака, рак легкого остается наиболее распространенным злокачественным новообразованием во всем мире. Так, в 2020 г. было выявлено более 2,2 млн. новых случаев [1]. Следует отметить, что низкий уровень мониторинга и раннего выявления рака лёгкого приводит к поздней постановке диагноза у значительной части пациентов с данным заболеванием, что в свою очередь обеспечивает неблагоприятный прогноз и исход (более 1,7 млн случаев). В российской популяции онкобольных в 2020 г. рак легкого диагностирован у 54 375 человек, в то же время у 39 371 человек диагностирован неблагоприятный исход. От рака легкого ежегодно умирает больше больных, чем от рака простаты, молочной железы и толстой кишки вместе взятых [2]. Поэтому многочисленные исследования сосредоточены на выявлении специфических и клинически применимых молекулярных биомаркеров для раннего выявления рака легкого.

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет примерно 85% всех случаев рака легкого. НМРЛ гистологически подразделяется на 2 основных подтипа: плоскоклеточный рак (ПРЛ) и аденокарциному (АДК) [3].

Следует отметить, что механизм онкогенеза НМРЛ связан с нарушением динамической регуляции клеточных процессов и обусловлен эпигенетическими факторами, которые играют критическую роль в регуляции экспрессии генов, в том числе и генов апоптоза, задействованных в патогенезе разных онкологических заболеваний, в том числе и НМРЛ [4]. Существует два пути активации апоптоза: рецептор-зависимый (внешний сигнальный путь с участием рецепторов смерти) и рецептор-независимый (внутренний митохондриальный) [5, 6]. Одним из основных генов, участвующих в рецептор-зависимом сигнальном пути активации апоптоза, является ген *DAPK1* (*Death-associated protein kinase 1*, 9q21.33). При реакции стимуляции (например, апоптотическими индукторами, онкогенами), увеличивается экспрессия pDAPK1, в результате чего опосредованно происходит активация p53 через путь p14/p19ARF, что в конечном счете, приводит к апоптозу [7, 8].

Митохондриальный путь активации апоптоза индуцируется повреждением ДНК, действием радиации, цитотоксических агентов, глюкокортикоидов и т.д. Он связан с экспрессией генов *BCL2L11/BIM* (*BCL2 like 11/BCL-2-interacting mediator of cell death*, 2q13) и *BAX* (*BCL-2 associated x protein*, 19q13.33) [9]. Эти

белки вызывают повышение проницаемости мембраны митохондрий, в результате в цитоплазму поступает апоптогенный белок цитохром С, который вместе с белковым продуктом гена *APAF1* (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*, 12q23.1) образует комплекс с каспазами необходимыми для протекания процесса апоптоза [10]. Напротив, белковый продукт гена *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*, 18q21.3) способствует понижению проницаемости мембраны митохондрий и может остановить процесс апоптоза. Кроме того, Bcl-2 образует комплекс с фактором апоптоза Araf-1, что сдерживает активацию каспазо-зависимого пути апоптоза [11].

Ранее имелись сообщения об аномальном метилировании генов *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2*, *BIM/BCL2L11* в некоторых видах опухолей, но данные о роли метилирования этих генов в прогрессии НМРЛ представлены единичными сообщениями [4, 12, 13]. Вопрос о роли метилирования промоторного CpG-островка в регуляции активности гена *BAX* и патогенезе НМРЛ не выяснен (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, июнь 2022).

Цель работы – исследование изменений уровня экспрессии и метилирования генов системы апоптоза, а именно, про-апоптотических генов *APAF1*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, и анти-апоптотического гена *BCL2* в прогрессии НМРЛ.

## Методика

Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина по системе TNM в соответствии с классификацией RUSSCO. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, одобрена этическим комитетом института и выполнялась по международным правилам работы с биоматериалом людей.

В табл. 1 приведены обобщенные данные по клинико-патоморфологическим характеристикам 28 исследованных парных образцов НМРЛ.

Высокомолекулярную ДНК и РНК выделяли из ткани стандартными методами. Анализ уровня метилирования проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе [14]. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения МС-ПЦР взяты из [15]. Исследование было проведено с использованием оборудования ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ. (Соглашение № 075-15-2021-684).

Анализ уровня экспрессии мРНК пяти генов *APAF1*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *BCL2* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с исполь-

зованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I в составе набора qPCRmix-HS SYBR (5x) в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSystem (Bio-Rad, США), последовательности праймеров для гена *BIM* приведены в табл. 2. Праймеры для генов *APAF1*, *DAPK1*, *BCL2*, *BAX* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем, относительно которого и проводили нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, взяты из работ [16, 17].

Таблица 1/ Table 1

**Клинико-патоморфологические параметры больных НМРЛ**  
**Clinical and pathomorphological parameters of NSCLC patients**

Клинико-патоморфологический параметр Clinical and pathomorphological parameters		n, (%)
Гистологический диагноз Histological diagnosis	Плоскоклеточный рак легкого Squamous cell lung cancer	15, (53,6)
	Аденокарцинома легкого Adenocarcinoma of lung	13, (46,4)
Стадия опухолевого процесса Stage of tumor process	I	11, (39,3)
	II	8, (28,6)
	III	7, (25,0)
	IV	2, (7,1)
Степень дифференцировки Differentiation grade	G1	2, (7,1)
	G2	14, (50,0)
	G3	12, (42,9)
Размер первичной опухоли Primary tumor size	T1	4, (14,3)
	T2	18, (64,3)
	T3	4, (14,3)
	T4	2, (7,1)
Лимфогенное метастазирование Lymphogenic metastasis	N0	12, (42,9)
	N1-3	16, (57,1)
Статус курильщика Smoker status	Курит / Smokes	14, (50,0)
	Не курит / No Smokes	14, (50,0)

Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по  $\Delta\Delta Ct$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее чем в 2 раза ( $|\Delta\Delta Ct| \leq 2$ ) рассматривали как отсутствие изменений [18].

**Статистический анализ.** Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ «IBM SPSS Statistics 22» и включала определение медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1–Q3). Для оценки значимости различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни, критерий Краскала–Уоллиса. Корреляционный анализ проводили посредством расчета коэффициента корреляции Спирмена и уровня его значимости. Различия считали существенными при  $p < 0.05$ , где  $p$  – показатель статистической значимости различий между изучаемыми выборками. Применяли поправку на множественное сравнение Бенджамини–Хохберга и оценивали величину FDR (false discovery rate, частота ложного обнаружения).

**Результаты**

В результате исследования уровня метилирования 5 апоптоз-ассоциированных белоккодирующих генов на 28 парных образцах НМРЛ было показано статистически значимое повышение уровня метилирования в опухолях легкого в сравнении с условной нормой для генов *BAX*, *DAPK1* и *BIM* ( $p \leq 0.001$ ,  $p = 0.035$  и  $p = 0.05$ , соответственно,  $FDR = 0.05$ ) (рис. 1, а). В то же время для анти-апоптозного гена *BCL2* показано значимое снижение уровня метилирования в опухолях НМРЛ в сравнении с условной нормой (рис. 1, а).

Стоит отметить, что при изучении уровня экспрессии мРНК (рис. 1, б), кодируемых этими генами, выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии у *BAX* и повышение экспрессии у *BCL2* ( $p = 0.0002$ ,  $FDR = 0.05$  и  $p = 0.0029$ ,  $FDR = 0.05$ , соответственно).

Полученные нами данные о метилировании изученных генов нашли свое подтверждение в ряде работ

Таблица 2/ Table 2

**Используемые праймеры для ПЦР-РВ**  
**RT-PCR primers used**

Ген Gene	Структура праймеров (5'-3') Primer Structure (5'-3')	$T_{отж}, ^\circ C$	Размер продукта п.н. Product size
<i>BIM</i>	F: TGCCAGGCCTTCAACCACTATCTCA R: GGGTGGTCTTCGGCTGCTGGTAAT	60	176

зарубежных авторов. Так в работе [19] метилирование гена *DAPK1* было значительно выше при раке легкого, чем в незлокачественных тканях легкого (32/104 (31%) против 3/16 (19%),  $p = 0,022$ ). Высокий уровень метилирования гена *DAPK1* был также отмечен и в других работах на раке легкого [8, 20].

Для гена *BIM* не все так однозначно. Нами показано статистически значимое повышение уровня метилирования гена в опухоли, что косвенно подтверждается работами зарубежных авторов, выполненных при других видах онкологии [21, 22]. Однако в работе [13] проведенной на образцах НМРЛ было показано, что основным эпигенетическим процессом инактивации гена *BIM* является ацетилирование гистонов.

Данные о гипометилировании гена *BCL2* и его гиперэкспрессии в опухоли нашли свое подтверждение в литературе [23, 24]

Далее нами был проведен корреляционный анализ зависимости между уровнем метилирования исследованных генов и экспрессией кодируемых ими мРНК. Обнаружено, что в исследованных первичных опухолях уровни метилирования генов *BAX*, *BIM* и *BCL2* статистически значимо ассоциированы с уровнями их экспрессии у больных с НМРЛ. Так, для гена *BCL2* было показано, что со снижением уровня метилирования в опухолевой ткани происходит статистически значимое ( $R_s = -0.783$ ,  $p < 0.001$ ,  $FDR = 0.01$ ) увеличение уровня экспрессии его мРНК. На рис. 2 представлены корреляционные зависимости между уровнем экспрессии мРНК и уровнями метилирования генов *BAX* и *BIM* у больных НМРЛ.

Основываясь на полученных нами данных о сильной отрицательной корреляции метилирования с экспрессией, можно сказать, что полученные результаты свидетельствуют о том, что гиперметилирование в опухоли является биологическим маркером изменения экспрессии генов мРНК. Следует подчеркнуть, что наши результаты согласуются как с данными мировых исследователей, полученными для других генов при НМРЛ, так и нашими собственными, полученными для других видов онкологии [4, 18, 25]

Во второй части нашей работы мы провели анализ изменения уровня метилирования и экспрессии в образцах первичных опухолей НМРЛ с учётом клинико-патоморфологических особенностей опухоли, таких как: стадия опухолевого процесса, размер опухоли, степень дифференцировки, наличие лимфогенного метастазирования, гистологического типа опухоли и статуса курильщика.

Нами впервые показано увеличение уровня метилирования гена *BAX* в образцах опухоли с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с образцами опухоли без оных ( $p = 0.033$ ,  $FDR = 0.05$ ) (рис. 3). Следует отметить, что показатели уровня экспрессии мРНК *BAX* в опухоли при этом статистически значимо снижались ( $p < 0.01$ ,  $FDR = 0.05$ ) (рис. 3). Таким образом, можно предположить, что данный ген является важным маркером прогрессии НМРЛ. Об измененной экспрессии *BAX* часто сообщают при НМРЛ [26]. Однако ни в одном из этих исследований не сделан вывод о том, что измененная экспрессия *BAX* имеет

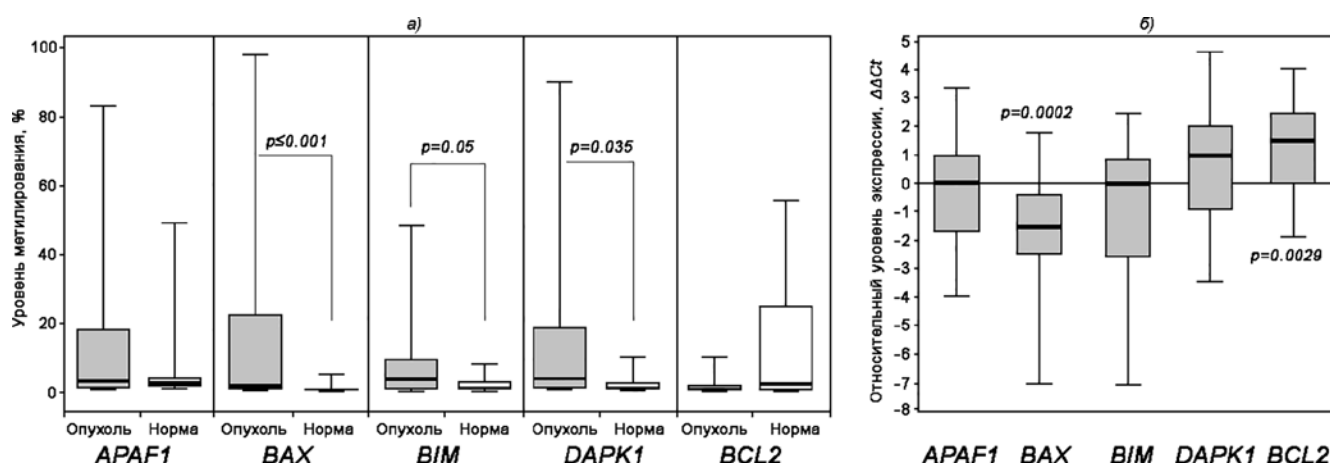
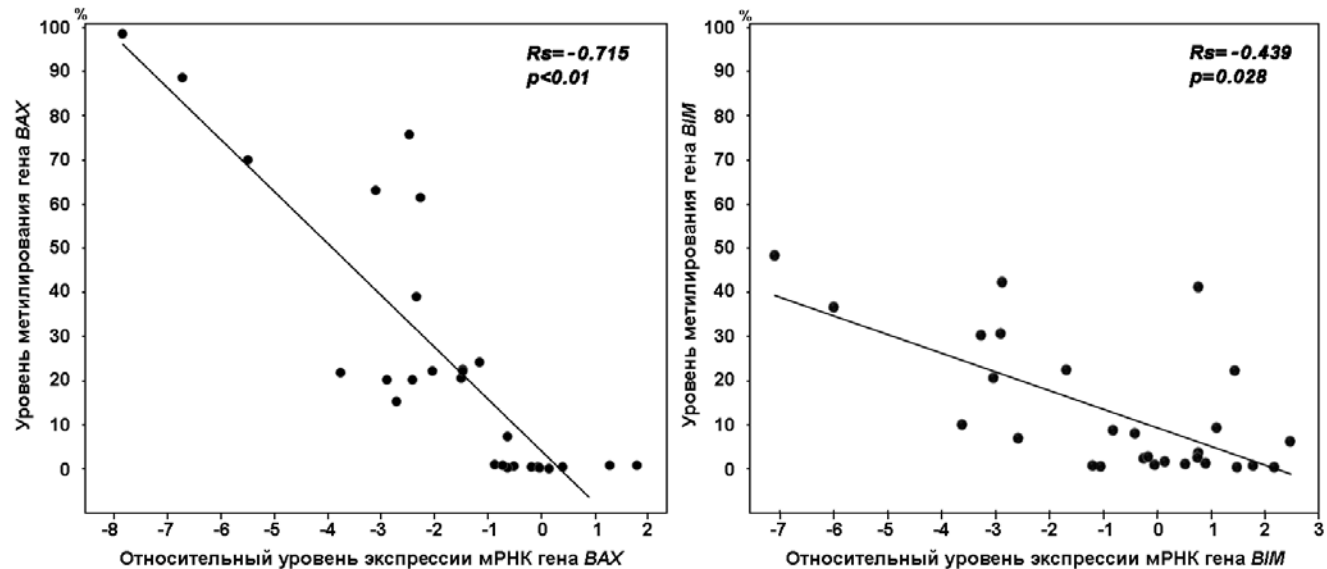


Рис. 1. Профили метилирования (а) и экспрессии (б) генов *APAF1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1*, *BCL2* в образцах НМРЛ. Рассчитано с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Показаны медианы и диапазон: верхний (3-й) и нижний (1-й) квартили.

Fig. 1. Methylation (a) and expression profiles (b) of *APAF1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1*, *BCL2* genes in NSCLC samples. Calculated using nonparametric Mann–Whitney test. Medians and range are shown: upper (3<sup>rd</sup>) and lower (1<sup>st</sup>) quartiles.

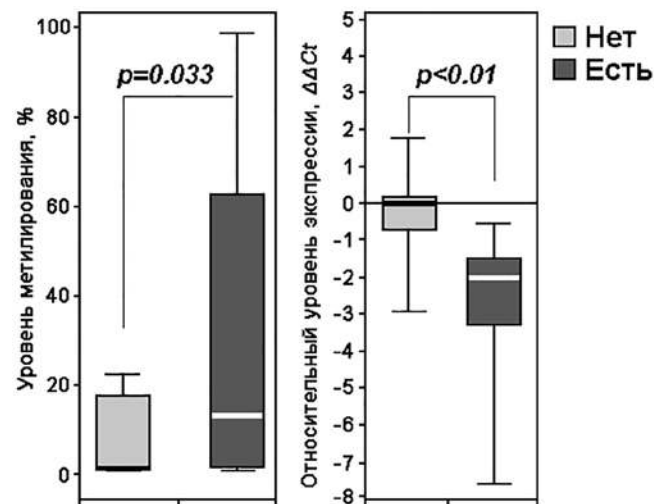


**Рис. 2.** Связь между экспрессией мРНК и метилированием ДНК.

По оси абсцисс – уровни экспрессии мРНК, определенные с помощью количественного анализа RT-PCR. По оси ординат – уровень метилирования ДНК (%) для каждого конкретного образца, исследованного с помощью количественной МС-ПЦР. Коэффициент корреляции Спирмена **Rs** и **p**-значение (двустороннее) корреляции отображаются в правом верхнем углу каждого графика.

**Fig 2.** Relationship between mRNA expression and DNA methylation.

Abscissa: mRNA expression levels determined by quantitative RT-PCR analysis. Ordinate: the level of DNA methylation (%) for each specific sample studied by quantitative RT-PCR. The Spearman correlation coefficient **Rs** and the **p**-value (two-sided) of the correlation are displayed in the upper right corner of each graph.



**Рис. 3.** Профиль метилирования и экспрессии для гена *BAX* в образцах НМРЛ с учётом наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования. Рассчитано с применением критерия Манна–Уитни. Показаны медианы и диапазон: верхний (3-й) и нижний (1-й) квартили.

**Fig. 3.** Methylation and expression profile for the *BAX* gene in NSCLC samples based on the presence or absence of lymphogenic metastasis. Calculated using the Mann–Whitney criterion. Medians and range are shown: upper (3<sup>rd</sup>) and lower (1<sup>st</sup>) quartiles.

существенное значение в качестве прогностического маркера, хотя ни одно из них не исследовали экспрессию *BAX* совместно с метилированием его промоторного CpG-островка.

В нашей работе нам не удалось выявить значимых изменений в уровнях метилирования и/или экспрессии у генов *DAPK1*, *BCL2*, *BIM*, *APAF1*, связанных с прогрессией НМРЛ, но в работе китайских ученых, показано, что увеличенный уровень метилирования гена *DAPK1* не только связан с развитием метастазов, но и с плохим прогнозом у пациентов с НМРЛ [27].

Таким образом, исследованные гены играют существенную роль в процессах клеточного гомеостаза и в случае нарушения динамических процессов эпигенетической регуляции могут быть вовлечены в пути злокачественной трансформации, в частности при НМРЛ и его гистологических подтипах.

**Заключение**

Таким образом, в проведенном нами исследовании показана корреляция уровня метилирования с уровнем экспрессии для исследуемых генов при НМРЛ. Во-первых, выявлено статистически значимое снижение уров-

ня экспрессии мРНК при гиперметиловании генов *BAH*, *BIM* у больных НМРЛ. И напротив, для *BCL2* показано статистически значимое увеличение уровня экспрессии мРНК при общем снижении уровня метилирования в опухоли. Во-вторых, показана взаимосвязь между изменением уровня экспрессии от уровня метилирования промоторного CpG-островка для гена *BAH* при метастазировании опухоли в лимфатические узлы. Таким образом, выявленные нами особенности представляются важными для понимания патогенеза НМРЛ; а исследование уровня метилирования и/или экспрессии может найти применение при разработке персонализированных подходов к диагностике, прогнозу и терапии больных НМРЛ.

*Авторы благодарят Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина за сбор и клинко-гистологическую характеристику образцов НМРЛ.*

### Литература

(п.п. 1; 3–27 см. References)

2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021.

### References

1. *Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/> (accessed May 18, 2022)
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality) [Zlokachestvennyye novobrazovaniya v Rossii v 2020 godu (zabolevaemost' i smertnost')]*. Moscow: P.A. Herzen Institute of Medical Research – Branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2021.
3. Sung S., Heymann J.J., Crapanzano J.P., Moreira A.L., Shu C., Bulman W.A., et al. Lung cancer cytology and small biopsy specimens: diagnosis, predictive biomarker testing, acquisition, triage, and management. *J Am Soc Cytopathol*. 2020; 9(5): 332-45. doi: 10.1016/j.jasc.2020.04.014. PMID: 32591241
4. Yang S., Huang Y., Zhao Q. Epigenetic Alterations and Inflammation as Emerging Use for the Advancement of Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2022; 13:878740. doi: 10.3389/fimmu.2022.878740. PMID: 35514980
5. Liu G., Pei F., Yang F., Li L., Amin A.D., Liu S., et al. Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 367. doi: 10.3390/ijms18020367. PMID: 28208579;
6. Singh P., Lim B. Targeting Apoptosis in Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2022; 24(3): 273-84. doi: 10.1007/s11912-022-01199-y. PMID: 35113355
7. Pfeffer C.M., Singh A.T.K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2): 448. doi: 10.3390/ijms19020448
8. Li Y., Zhu M., Zhang X., Cheng D., Ma X. Clinical significance of DAPK promoter hypermethylation in lung cancer: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 1785-96. doi: 10.2147/DDDT.S78012. PMID: 25848215
9. Tan Y.Q., Zhang X., Zhang S., Zhu T., Garg M., Lobbie P.E., et al. Mitochondria: The metabolic switch of cellular oncogenic transformation. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021; 1876(1): 188534. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188534. PMID: 33794332
10. Shakeri R., Kheirollahi A., Davoodi J. Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. *Biochimie*. 2021; 190: 91-110. doi: 10.1016/j.biochi.2021.07.004. PMID: 34298080
11. Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2022; 230: 107943. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107943. PMID: 34182005
12. Zhao Y., Zhou H., Ma K., Sun J., Feng X., Geng J., et al. Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2013; 5(4): 1211-8. doi: 10.3892/ol.2013.116
13. Zhao M., Zhang Y., Li J., Li X., Cheng N., Wang Q., et al. Histone deacetylation, as opposed to promoter methylation, results in epigenetic BIM silencing and resistance to EGFR TKI in NSCLC. *Oncol Lett*. 2018; 15(1): 1089-96. doi: 10.3892/ol.2017.7411. PMID: 29399169
14. Loginov V.I., Pronina, I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Kazubskaya, T.P., et al. Aberrant Methylation of 20 miRNA Genes Specifically Involved in Various Steps of Ovarian Carcinoma Spread: From Primary Tumors to Peritoneal Macroscopic Metastases. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 1300. doi: 10.3390/ijms23031300
15. Braga E.A., Burdenny A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Fridman M.V., et al. 4 Markers system based on the methylation of the group of pro-apoptotic genes in combination with miRNA in the diagnosis of breast cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 168(9): 338-42.
16. 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. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018
17. Kontos C.K., Fendri A., Khabir A., Mokdad-Gargouri R., Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the BCL2-associated X gene in nasopharyngeal carcinoma: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2013; 13, e293. doi: 10.1186/1471-2407-13-293
18. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Dmitriev A.A., et al. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene*. 2016 576(1 Pt 3): 483-91. doi: 10.1016/j.gene.2015.10.059
19. Daniunaite K., Sestokaite A., Kubiliute R., Stuopelyte K., Ketunien E., Husgafvel-Pursiainen K., et al. Frequent DNA methylation changes in cancerous and noncancerous lung tissues from smokers with non-small cell lung cancer. *Mutagenesis*. 2020:geaa022. doi: 10.1093/mutage/geaa022. PMID: 32914849
20. Huang X., Wu C., Fu Y., Guo L., Kong X., Cai H. Methylation analysis for multiple gene promoters in non-small cell lung cancers in high indoor air pollution region in China. *Bull Cancer*. 2018; 105(9): 746-54. doi: 10.1016/j.bulcan.2018.05.004. PMID: 3012660
21. San José-Eneriz E., Agirre X., Jiménez-Velasco A., Cordeu L., Martín V., Arqueros V., et al. Epigenetic downregulation

- of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 1877–89. doi: 10.1016/j.ejca.2009.04.005
22. Richter-Larrea J.A., Robles E.F., Fresquet V., Beltran E., Rullan A.J., Agirre X., et al. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood*. 2010; 116: 2531–42. doi: 10.1182/blood-2010-02-268003
  23. Lekk K., Vooder T., Kolde R., et al. Methylation markers of early-stage non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012; 7:e39813/
  24. Pargol M., Zare Karizi S., Akbari M., Nourmohammadi B., Shadmehri M.B., Karimipour M., et al. Investigation the Role of Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021; 22(3): 947–55. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.3.947. PMID: 33773561
  25. 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 SEMA3B gene in human lung and renal cancers: influence on cancer progression and angiogenesis. *PLoS ONE*. 2015, 10(5):e0123369
  26. Paul I., Jones J.M. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5(4): 588–94. doi: 10.5306/wjco.v5.i4.588. PMID: 25302163
  27. Zhang J., Yu X.L., Zheng G.F., Zhao F. DAPK promoter methylation status correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15(5): 609–17. doi: 10.3233/CBM-150501. PMID: 26406950

**Сведения об авторах:**

**Губенко Марина Сергеевна**, мл. науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Логинов Виталий Игоревич**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Бурденный Алексей Михайлович**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

**Пронина Ирина Валерьевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Филиппова Елена Александровна**, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

**Казубская Татьяна Павловна**, доктор мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

**Перцов Сергей Сергеевич**, чл.-корр. РАН, доктор. мед. наук, проф. РАН, гл. науч. сотр. лаб. системных механизмов эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина»