

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК [575.224+575.23]:616.62-006
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-263-275>

Поступила в редакцию 10.05.2018
Received 10.05.2018

М. П. Смаль¹, Н. В. Никитченко¹, А. И. Ролевич², Т. И. Набебина²,
С. А. Красный², Р. И. Гончарова¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, агр. Лесной, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ *CDKN2A* И *TIMP3* ПРИ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Аннотация. Одним из механизмов нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов является гиперметилирование промоторных областей генов-онкосупрессоров, которое часто наблюдается в злокачественных новообразованиях различной локализации. Профиль мутационных и эпигенетических изменений характеризует злокачественный потенциал опухоли, а также ее способность к инвазии и метастазированию.

Цель исследования состояла в определении прогностической роли статуса метилирования генов *p16*, *p14ARF* и *TIMP3* при раке мочевого пузыря на примере выборки из 158 пациентов. Эпигенетические изменения исследованных генов наблюдались с частотой 11,4; 0 и 10,8 % соответственно и не зависели от клинико-морфологических характеристик.

Установлена статистически значимая ассоциация аномального метилирования генов *p16* и *TIMP3* с курением, что указывает на возможное влияние канцерогенов табачного дыма на возникновение данных эпигенетических изменений. Многофакторный регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса показал независимую прогностическую значимость гиперметилирования промоторной области гена *p16* в отношении прогрессирования рака мочевого пузыря без мышечной инвазии (отношение рисков 6,84; 95 % ДИ 1,6–29,9; $p = 0,011$).

Применение полученных данных об эпигенетической изменчивости *p16* позволит повысить точность прогноза клинического течения рака мочевого пузыря и подобрать адекватную тактику лечения.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, эпигенетические изменения, метилирование, *CDKN2A* (*p16*, *p14ARF*), *TIMP3*, прогностическое значение

Для цитирования: Оценка прогностического значения метилирования генов *CDKN2A* и *TIMP3* при раке мочевого пузыря / М. П. Смаль [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2018. – Т. 15, № 3. – С. 263–275. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-263-275>

M. P. Smal¹, N. V. Nikitchenko¹, A. I. Rolevich², T. I. Nabebina², S. A. Krasny², R. I. Goncharova¹

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Lesnoy, Republic of Belarus

ASSESSMENT OF A PROGNOSTIC VALUE OF *CDKN2A* AND *TIMP3* GENE METHYLATION IN BLADDER CANCER

Abstract. Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes is one of the mechanisms of epigenetic regulation disturbance of gene expression and is often observed in different cancer types. The profile of mutational and epigenetic changes characterizes a malignant potential of a tumor, as well as its ability to invade and metastasize.

The aim of the study was to determine a prognostic value of *p16*, *p14ARF* and *TIMP3* gene methylation in the group of 158 bladder cancer patients. Epigenetic changes in these genes were observed with a frequency of 11.4, 0 and 10.8 %, respectively, and did not depend on clinic-morphological characteristics.

A statistically significant association of *p16* and *TIMP3* abnormal methylation with smoking was found, indicating a possible influence of tobacco smoke carcinogens on the occurrence of these epigenetic changes. In the multivariate Cox regression analysis, *p16* promoter hypermethylation was an independent predictor for bladder cancer progression (HR 6.84; 95 % CI 1.6–29.9; $p = 0.011$).

The use of the data on the *p16* methylation status may improve the accuracy of prognosis of the bladder cancer clinical course and the selection of appropriate treatment strategy.

Keywords: bladder cancer, epigenetic changes, methylation, *CDKN2A* (*p16*, *p14ARF*), *TIMP3*, prognostic value

For citation: Smal M. P., Nikitchenko N. V., Rolevich A. I., Nabebina T. I., Krasny S. A., Goncharova R. I. Assessment of a prognostic value of *CDKN2A* and *TIMP3* gene methylation in bladder cancer. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2018, vol. 15, no. 3, pp. 263–275 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-263-275>

Введение. В структуре всех онкологических заболеваний населения Республики Беларусь рак мочевого пузыря (РМП) составляет 2,7 % [1], причем отмечается тенденция к постоянному росту заболеваемости. В период с 2004 по 2013 г. наблюдалось увеличение частоты выявления новых случаев РМП с 11,4 до 12,7 на 100 000 жителей [1]. Опухоли мочевого пузыря чрезвычайно гетерогенны: обладают различным потенциалом к мышечной инвазии, рецидивированию, прогрессированию и метастазированию. Нередки случаи, когда результаты лечения пациентов, имеющих опухоли одной классификационной категории, существенно различаются. При этом наиболее сложной в плане выбора терапевтического подхода является группа немышечно-инвазивных опухолей, вероятность рецидивирования и прогрессирования которых может варьироваться от 15 до 70 % и от 7 до 40 % соответственно [2]. Недостаточно высокая объективность и воспроизводимость применяемых в настоящее время патогистологических критериев для определения риска развития тех или иных отдаленных результатов лечения обуславливает поиск дополнительных факторов прогноза.

Наиболее перспективными прогностическими маркерами являются молекулярные изменения протоонкогенов и генов-супрессоров опухолей, лежащие в основе процесса злокачественной трансформации клетки. Инактивация генов-онкосупрессоров происходит за счет точковых мутаций, аллельных делеций, хромосомных нарушений и эпигенетических изменений, приводящих к потере функции соответствующих белков.

Практически во всех злокачественных новообразованиях наблюдается нарушение эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, наиболее изученным из которых является метилирование ДНК [3, 4]. Опухолевые клетки мочевого пузыря, подобно другим типам рака, характеризуются глобальным гипометилированием и сайт-специфическим гиперметилированием CpG-островков в регуляторных областях генов, задействованных в поддержании клеточного гомеостаза [5]. Гиперметилирование ДНК приводит к транскрипционному сайленсингу генов-онкосупрессоров и часто ассоциировано с агрессивным клиническим течением заболевания [6, 7]. Так, по результатам некоторых исследований сообщалось о связи инактивации генов *CDKN2A* и *TIMP3* посредством метилирования их промоторных областей с неблагоприятным прогнозом при РМП [8–10].

Ген *CDKN2A* кодирует два транскрипта – *p16* и *p14ARF*, белковые продукты которых участвуют в регуляции клеточного цикла и апоптоза за счет модуляции активности Rb- и p53-путей [11]. Белок p16, препятствуя образованию комплексов CDK4/cyclin D1, удерживает тем самым Rb в дефосфорилированном состоянии, что не позволяет клетке вступить в S-фазу [12]. Белок p14ARF стабилизирует p53, нарушая его взаимодействие с убиквитинлигазой MDM2 [13]. Тканевый ингибитор металлопротеиназ 3 (*TIMP3*) является одним из членов семейства белков, которые контролируют активность матриксных металлопротеиназ (ММП) и поэтому рассматриваются в качестве потенциальных супрессоров ангиогенеза, опухолевой инвазии и метастазирования [14].

Эпигенетические изменения *p16*, *p14ARF* и *TIMP3* обнаружены в злокачественных новообразованиях различной локализации [15–20]. В отношении РМП данные о частоте и связи аномального метилирования этих генов с определенным опухолевым фенотипом достаточно противоречивы, а его прогностическое значение остается спорным.

Цель настоящего исследования – определение роли эпигенетических изменений *p16*, *p14ARF* и *TIMP3* в развитии и прогрессировании рака мочевого пузыря.

Материалы и методы исследования. В группу исследования были включены 158 пациентов (124 мужчины и 34 женщины) в возрасте от 38 до 88 лет (среднее значение – $66,5 \pm 10,4$ года;

медиана – 68 лет) с гистологически подтвержденным диагнозом РМП, проходивших лечение в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова в период с 2010 по 2014 г. Все случаи РМП классифицированы по системе TNM (2002). Степень дифференцировки опухолевой ткани определяли гистологически в соответствии с классификациями ВОЗ 1973 и 2004 гг. Клинико-анамнестические данные пациентов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-анамнестические характеристики пациентов
Table 1. Clinical and demographic characteristics of patients

Характеристика	Класс	Общее к-во пациентов	Частота, %
Пол	Мужской	124	78,5
	Женский	34	21,5
Возраст, лет	До 60	40	25,3
	61–70	46	29,1
	71 и более	72	45,6
Категория T	Ta	17	10,8
	T1	86	54,4
	T ≥ 2	55	34,8
Наличие метастазов	Да	14	8,9
	Нет	144	91,1
Размер опухоли, см	До 3	69	43,7
	3 и более	89	56,3
Степень дифференцировки (ВОЗ, 1973)	G1	54	34,2
	G2	70	44,3
	G3	33	20,9
	Нет данных	1	0,6
Степень дифференцировки (ВОЗ, 2004)	PUNLMP/Low grade	88	55,7
	High grade	70	44,3
Мультифокальность опухоли	Одиночная опухоль	55	34,8
	Множественная опухоль	103	65,2
Макроскопический вид опухоли	Папиллярная	115	72,8
	Солидная/смешанная	43	27,2
Статус курения	Не курит	46	29,1
	Курил ранее	47	29,7
	Курит	58	36,7
	Нет данных	7	4,4

Примечание. PUNLMP (рус. ПУОНЗП) – папиллярная уротелиальная опухоль с низким злокачественным потенциалом.

Рецидивирование и прогрессирование заболевания учитывали только для группы пациентов с РМП без мышечной инвазии (РМП БМИ). За местный рецидив принимали повторное появление морфологически верифицированной переходноклеточной карциномы в стадии Ta, T1 или Tis, локализующейся в мочевом пузыре. Прогрессирование опухолевого процесса устанавливали в случае развития мышечно-инвазивной опухоли и/или регионарных либо отдаленных метастазов у пациентов, ранее получавших лечение по поводу РМП БМИ. Под скорректированной (онкоспецифической) выживаемостью понимали время от момента постановки диагноза до смерти от РМП.

Выделение геномной ДНК проводили из свежего опухолевого материала посредством ферментативной обработки образцов протеиназой K, фенол-хлороформной экстракции и преципитации в этаноле.

Для бисульфитной модификации ДНК использовали набор EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Статус метилирования промоторной области генов *p16*, *p14ARF* и *TIMP3* определяли с помощью метил-специфической ПЦР с праймерами [21], подобранными к метилированному и неметилированному аллелю (табл. 2). Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержала 100 нг бисульфит-конвертиро-

ванной ДНК, 1×ПЦР буфер, 0,2 мкМ каждого праймера («Праймтех», Беларусь), 0,2 мМ dNTPs и 0,3 единицы активности Tornado Taq полимеразы («Праймтех»). В случае анализа метилирования генов *p16* и *TIMP3* в реакционную смесь дополнительно вносили диметилсульфоксид в конечной концентрации 5 %. После 15-минутной инкубации при 95 °С проводили 40 циклов амплификации (денатурация при 99 °С – 1 с, отжиг при температуре, указанной в табл. 2, – 10 с, элонгация при 72 °С – 10 с). Конечную элонгацию осуществляли в течение 2 мин при 72 °С. В качестве положительного контроля метилирования использовали *in vitro* метилированную ДНК, полученную посредством обработки CpG-метилтрансферазой (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Т а б л и ц а 2. Последовательности праймеров
Table 2. Primer sequences

Ген	Аллель	Праймеры	Температура отжига, °С	Размер продукта, п. н.
<i>p16</i>	М	F: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC R: GACCCCGAACCGCGACCGTAA	65	150
	U	F: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT R: CAACCCCAAACCACAACCATAA	62	151
<i>p14ARF</i>	М	F: GTGTAAAGGGCGGCGTAGC R: AAAACCCTCACTCGCGACGA	66	132
	U	F: TTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT R: CACAAAACCCTCACTCACAACAA	63	132
<i>TIMP3</i>	М	F: CGTTTCGTATTTTTGTTTTCGGTTTC R: CCGAAAACCCCGCCTCG	59	116
	U	F: TTTTGTTTGTATTTTTGTTTTGTTTT R: CCCCCAAAACCCACCTCA	62	122

Пр и м е ч а н и е. М – метилированный аллель, U – неметилированный аллель.

Анализ продуктов метил-специфической ПЦР проводили в 8 %-ном полиакриламидном геле при напряжении 130 В. Результаты электрофореза визуализировали с помощью бромистого этидия.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.). При анализе бинарных признаков статистическую значимость различий между исследуемыми группами определяли с помощью теста χ^2 или двустороннего точного критерия Фишера. Безрецидивную выживаемость, выживаемость до прогрессирования и скорректированную выживаемость оценивали по методу Каплана–Мейера, значимость различий между показателями выживаемости определяли при помощи log-rank теста. Влияние потенциальных факторов риска на отдаленные результаты лечения оценивали с помощью моно- и мультивариантного регрессионного анализа пропорциональных рисков Кокса. В мультивариантный анализ были включены переменные, показавшие наибольшую статистическую значимость ($p < 0,1$) в моновариантном анализе. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Частота эпигенетических изменений генов *p16*, *p14ARF* и *TIMP3* в опухолях мочевого пузыря. Метилирование гена *p14ARF* нами не обнаружено ни в одном из 68 образцов уротелиальных карцином (рис. 1). Ввиду этого анализ всей выборки пациентов на наличие данных эпигенетических нарушений представлялся нецелесообразным.

Аномальное метилирование гена *p16* выявлено в 18 из 158 опухолей мочевого пузыря, что составило 11,4 %. Эпигенетические изменения гена *TIMP3* наблюдались с частотой 10,8 % (в 17 из 158 уротелиальных карцином). Примеры результатов анализа эпигенетических нарушений *p16* и *TIMP3* представлены на рис. 2 и 3 соответственно.

В ряде исследований сообщалось о высокой частоте аномального метилирования промоторных областей генов *p16* и *p14ARF* при различных типах рака, в том числе при лимфоме, раке желудка, печени, пищевода, плоскоклеточной карциноме головы и шеи [15–19]. При РМП, согласно данным разных авторов, частота эпигенетических изменений в локусе *CDKN2A* варьируется

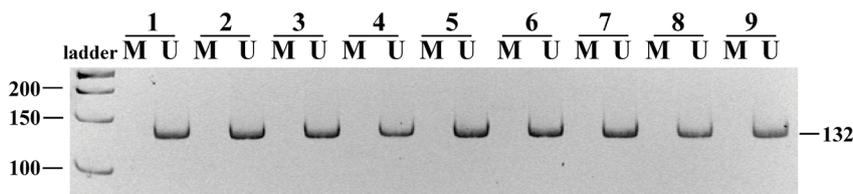


Рис. 1. Анализ метилирования гена *p14ARF* в опухолевой ткани. Цифрами обозначены номера образцов ДНК, выделенной из опухолевого материала. Наличие ПЦР-продукта в лунке М указывает на присутствие метилированного аллеля, в лунке U – неметилированного аллеля

Fig. 1. Analysis of the methylation of the *p14ARF* gene in tumor tissues. The numbers denote the numbers of DNA samples isolated from the tumor material. PCR products in lane M indicate the presence of methylated alleles, whereas PCR products in lane U indicate the presence of unmethylated alleles

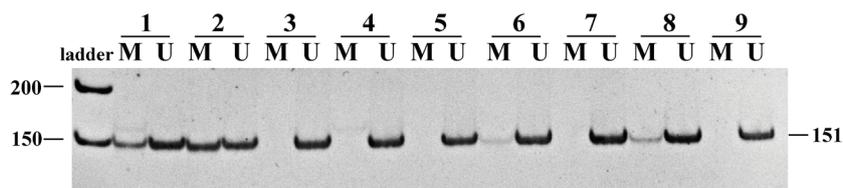


Рис. 2. Анализ метилирования гена *p16* в опухолевой ткани. В образцах 1, 2, 6 и 8 наблюдается метилирование гена *p16*, в образцах 3, 4, 5, 7 и 9 метилирование отсутствует

Fig. 2. Analysis of the methylation of the *p16* gene in tumor tissues. Samples 1, 2, 6 and 8 show the presence of methylation of the *p16* gene; samples 3, 4, 5, 7 and 9 – the absence of methylation

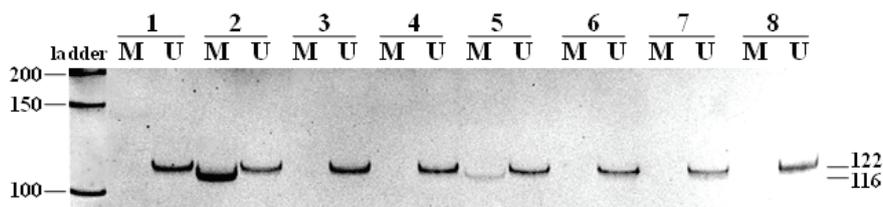


Рис. 3. Анализ метилирования гена *TIMP3* в опухолевой ткани. В образцах 2 и 5 наблюдается метилирование гена *TIMP3*, в образцах 1, 3, 4, 6, 7 и 8 метилирование отсутствует

Fig. 3. Analysis of the methylation of the *TIMP3* gene in tumor tissues. Samples 2 and 5 show the presence of methylation of the *TIMP3* gene; samples 1, 3, 4, 6, 7 and 8 – the absence of methylation

в пределах от 0 до 73 % [22, 23]. Подобно полученным нами результатам, в работах Serizawa с соавт. [22] и Friedrich с соавт. [24] метилирование гена *p14ARF* не выявлено ни в одном случае уротелиальной карциномы. Наиболее близкие к установленным нами значения частоты эпигенетических нарушений гена *p16* определены Friedrich с соавт. [25] и Orlow с соавт. [26]. Отличия полученных нами результатов с данными, приведенными в других работах [8, 23, 27], обусловлены составом включенных в исследование опухолей и применяемыми методами анализа. Кроме того, обнаруженная нами сравнительно невысокая частота (11,4 %) аномального метилирования *CDKN2A* может быть обусловлена тем, что значительная доля уротелиальных карцином несет гомо- и гетерозиготные делеции этого локуса, захватывающие CpG-островки (10–30 и 40–60 % случаев соответственно) [28].

TIMP3 представляет собой секретируемый белок размером 24 кДа, единственный из всего семейства непосредственно связывающийся с внеклеточным матриксом [14]. В исследовании Waschman с соавт. [20] продемонстрирована значимая корреляция между аномальным метилированием и снижением экспрессии *TIMP3* в различных раковых линиях клеток (легких, молочной железы, толстого кишечника), а также *in vivo* в почечно-клеточной карциноме. Полученные нами результаты о частоте эпигенетических изменений гена *TIMP3* согласуются с представленными в работе Garcia-Baquero с соавт. [10] данными, согласно которым исследуемый показатель составляет 11,5 %.

Ассоциация метилирования генов *p16* и *TIMP3* с клинико-морфологическими и демографическими характеристиками. Статистическая обработка данных показала отсутствие достоверной связи эпигенетических нарушений генов *p16* и *TIMP3* с демографическими и клинико-морфологическими параметрами (табл. 3), тем не менее в определенных подгруппах пациентов обнаружены некоторые закономерности в их распределении.

Т а б л и ц а 3. Метилирование генов *p16* и *TIMP3* в зависимости от демографических и патоморфологических характеристик
T a b l e 3. Methylation of the *p16* and *TIMP3* genes depending on demographic and pathomorphological characteristics

Характеристика	Класс	К-во событий/общее число пациентов			
		Метилирование <i>p16</i> , n (%)	<i>p</i>	Метилирование <i>TIMP3</i> , n (%)	<i>p</i>
Пол	Мужской	17/124 (13,7)	0,12	15/124 (12,1)	0,53
	Женский	1/34 (2,9)		2/34 (5,9)	
Возраст, лет	До 60	5/36 (13,9)	0,56	6/36 (16,7)	0,22
	60 и более	13/122 (10,7)		11/122 (9,0)	
Опухоль	Первичная	15/125 (12,0)	0,77	14/125 (11,2)	1,0
	Рецидивная	3/33 (9,1)		3/33 (9,1)	
Категория T	Ta	1/17 (5,9)	0,88	0/17 (0)	0,36
	T1	10/86 (11,6)		10/86 (11,6)	
	T ≥ 2	7/55 (12,7)		7/55 (12,7)	
Наличие метастазов	Да	1/14 (7,1)	1,0	1/14 (7,1)	1,0
	Нет	17/144 (11,8)		16/144 (11,1)	
Размер опухоли, см	До 3	8/69 (11,6)	1,0	5/69 (7,2)	0,3
	3 и более	10/89 (11,2)		12/89 (13,5)	
Степень дифференцировки (ВОЗ, 1973)	G1	5/54 (9,3)	0,42	4/54 (7,4)	0,60
	G2	7/70 (9,7)		9/70 (12,9)	
	G3	6/33 (17,6)		4/33 (12,1)	
Степень дифференцировки (ВОЗ, 2004)	PUNLMP/Low grade	11/88 (12,5)	0,80	6/88 (6,8)	0,12
	High grade	7/70 (10,0)		11/70 (15,7)	
Мультифокальность опухоли	Одиночная	6/55 (10,9)	1,0	5/55 (9,1)	0,79
	Множественная	12/103 (11,7)		12/103 (11,7)	
Макроскопический вид опухоли	Папиллярная	13/115 (11,3)	1,0	12/115 (10,4)	0,78
	Солидная/смешанная	5/43 (11,6)		5/43 (11,6)	
Статус курения	Не курит	2/46 (4,3)	0,062	3/46 (6,5)	0,27
	Курит/курил ранее	16/105 (15,2)		14/105 (13,3)	

Гиперметилирование промоторной области гена *p16* при мышечно-инвазивном РМП наблюдалось несколько чаще (12,7 %), чем при РМП без мышечной инвазии (10,7 %) ($p = 0,79$), причем наименьшая частота эпигенетических нарушений, равная 5,9 %, отмечалась в уротелиальных карциномах категории Ta. Полученные нами данные находятся в соответствии с результатами проведенного Qi с соавт. [29] мета-анализа, которые указывают на специфичность метилирования *p16* к опухолевой ткани мочевого пузыря, но в то же время и на отсутствие его достоверной связи с особенностями клинического течения РМП.

Нами выявлена тенденция ($p = 0,062$) к увеличению частоты аномального метилирования *p16* у курящих или куривших ранее пациентов (табл. 3). При этом только у пациентов с неммышечно-инвазивными уротелиальными карциномами наблюдаемая тенденция достигла уровня статистической значимости ($p = 0,014$). Так, у некурящих пациентов аномальное метилирование *p16* не обнаружено ни в одном из 33 случаев, у курящих его частота составила 16,9 % (11 из 65 наблюдений).

Метилирование гена *TIMP3*, как и гена *p16*, чаще регистрировалось в мышечно-инвазивных опухолях (12,7 %), чем в неммышечно-инвазивных (9,7 %) ($p = 0,59$), при категории Ta метилирование *TIMP3* отсутствовало во всех проанализированных образцах. Несмотря на то что в некоторых работах сообщалось о связи эпигенетических изменений *TIMP3* с инвазией и низкой степенью дифференцировки опухоли [10, 23], нам не удалось выявить такой зависимости.

В настоящем исследовании при анализе подгруппы пациентов с РМП БМИ обнаружена статистически значимая ассоциация метилирования *TIMP3* ($p = 0,049$) с более длительным стажем курения: у пациентов, куривших более 20 лет, частота метилирования достигла 16,7 % (8 из 48 случаев), у некурящих или куривших менее 20 лет – 4 % (2 из 50 случаев).

Интересным представляется выявление прямой статистически значимой зависимости между эпигенетическими изменениями генов *p16* и *TIMP3* ($p < 0,001$), что может указывать на существование общих механизмов их возникновения. При отсутствии метилирования *TIMP3* эпигенетические изменения гена *p16* наблюдались в 7,1 % уротелиальных карцином (10 из 141 случая), а при его наличии – в 47,1 % (8 из 17 случаев).

Объединение данных о статусе метилирования генов *TIMP3* и *p16* позволило выявить значимую ассоциацию ($p = 0,047$) исследуемых эпигенетических изменений с курением в подгруппе пациентов с РМП БМИ. В группе курящих или куривших ранее пациентов частота аномального метилирования хотя бы одного из генов составила 23,1 % (15 из 65 случаев), тогда как в группе некурящих этот показатель был равен 6,1 % (2 из 33 случаев).

Известно, что до 50 % всех случаев РМП обусловлены негативным влиянием канцерогенов табачного дыма. Последние, по-видимому, индуцируют изменения профиля метилирования ряда генов-мишеней, что отражается в нарушении регуляции важнейших клеточных процессов и, в конечном счете, приводит к возникновению и/или манифестации онкологических заболеваний. В работе Marsit с соавт. [30] на большой выборке пациентов с РМП показана значимая связь метилирования *CDKN2A* с курением, что согласуется с нашими данными.

Оценка прогностического значения статуса метилирования генов p16 и TIMP3. Полагают, что нарушение профиля эпигенетической изменчивости обуславливает не только инициацию канцерогенеза, но и его прогрессирование. Поэтому следующим этапом работы стала оценка роли метилирования генов *p16* и *TIMP3* в предсказании отдаленных результатов лечения РМП.

Анализ прогностического значения эпигенетических изменений проводили на выборке из 146 пациентов, отдаленные результаты лечения 12 человек не прослежены. Длительность наблюдения колебалась от 32 до 60 мес., медиана наблюдения составила 46 мес. В течение этого периода в группе из 94 пациентов с РМП БМИ выявлено 27 (28,7 %) рецидивов, в 13,8 % случаев (13 из 94) зарегистрировано прогрессирование в мышечно-инвазивную форму. В общей группе пациентов 48 человек умерло, в том числе 24 от РМП.

Как видно из табл. 4, нами не выявлено прогностической ценности эпигенетических изменений исследуемых генов для предсказания рецидивов и онкоспецифической выживаемости пациентов.

В то же время наблюдалось значительное снижение 3-летней выживаемости до прогрессирования при наличии гиперметилирования *p16* по сравнению с его отсутствием: 66,7 % (95 % ДИ 35,9–97,5) и 87,6 % (95 % ДИ 80,3–94,9) соответственно (рис. 4).

В однофакторном регрессионном анализе Кокса влияние эпигенетических изменений *p16* на повышение риска прогрессирования не достигло статистической значимости (отношение рисков (ОР) 3,34; 95 % ДИ 0,9–12,2; $p = 0,067$). Вместе с тем в многофакторной модели с пошаговым исключением независимыми предикторами более низких уровней выживаемости до прогрессирования являлись наличие предшествующих рецидивов (ОР 13,59; 95 % ДИ 3,7–50,0; $p < 0,001$), гиперметилирование *p16* (ОР 6,84; 95 % ДИ 1,6–29,9; $p = 0,011$), возраст старше 70 лет (ОР 4,89; 95 % ДИ 1,4–16,9; $p = 0,012$) и низкая степень дифференцировки опухоли (ОР 5,07; 95 % ДИ 1,4–18,7; $p = 0,015$) (табл. 5).

Результаты большинства исследований свидетельствуют об отсутствии прогностической роли эпигенетических изменений *p16* и *p14ARF* для предсказания отдаленных результатов лечения РМП [31–33]. Тем не менее, в некоторых работах отмечалась связь метилирования этих генов с повышенным риском рецидивов [8], прогрессированием опухоли [9], снижением общей и онкоспецифической выживаемости [14, 27]. Нами установлено независимое от стандартных клинических факторов прогноза влияние эпигенетических нарушений *p16* на риск прогрессирования РМП БМИ, что открывает возможности для их применения в качестве молекулярных маркеров прогноза клинического течения заболевания.

Таблица 4. Анализ прогностического значения аномального метилирования генов *p16* и *TIMP3* в отношении отдаленных результатов леченияTable 4. Analysis of the prognostic value of *p16* and *TIMP3* abnormal methylation with respect to the recurrence-free, progression-free, overall and cancer-specific survival

Отдаленные результаты лечения	Подгруппа	К-во событий/ общее число пациентов	3-летняя выживаемость (95 % ДИ), %	<i>p</i> (log-rank)
Рецидивирование	<i>p16 unmeth</i>	24/85	75,4 (66,0–84,8)	0,54
	<i>p16 meth</i>	3/9	66,7 (35,9–97,5)	
	<i>TIMP3 unmeth</i>	26/87	73,7 (64,3–83,1)	0,42
	<i>TIMP3 meth</i>	1/7	85,7 (59,8–100)	
Прогрессирование	<i>p16 unmeth</i>	10/85	87,6 (80,3–94,9)	0,052
	<i>p16 meth</i>	3/9	66,7 (35,9–97,5)	
	<i>TIMP3 unmeth</i>	13/87	84,4 (76,6–92,2)	0,29
	<i>TIMP3 meth</i>	0/7	100	
Общая выживаемость	<i>p16 unmeth</i>	44/130	71,3 (63,5–79,1)	0,60
	<i>p16 meth</i>	4/16	75,0 (53,8–96,2)	
	<i>TIMP3 unmeth</i>	44/132	71,6 (63,8–79,4)	0,71
	<i>TIMP3 meth</i>	4/14	71,4 (47,7–95,1)	
Скорректированная выживаемость	<i>p16 unmeth</i>	21/130	83,4 (76,7–90,1)	0,79
	<i>p16 meth</i>	3/16	81,3 (62,1–100)	
	<i>TIMP3 unmeth</i>	22/132	82,8 (76,1–89,5)	0,82
	<i>TIMP3 meth</i>	2/14	85,7 (67,3–100)	
Скорректированная выживаемость при РМП БМИ	<i>p16 unmeth</i>	7/82	91,9 (85,6–98,2)	0,78
	<i>p16 meth</i>	1/9	88,9 (68,3–100)	
	<i>TIMP3 unmeth</i>	8/84	90,8 (84,3–97,3)	0,38
	<i>TIMP3 meth</i>	0/7	100	
Скорректированная выживаемость при МИ РМП	<i>p16 unmeth</i>	14/48	67,7 (53,8–81,6)	0,96
	<i>p16 meth</i>	2/7	71,4 (37,9–100)	
	<i>TIMP3 unmeth</i>	14/48	67,7 (53,8–81,6)	0,96
	<i>TIMP3 meth</i>	2/7	71,4 (37,9–100)	

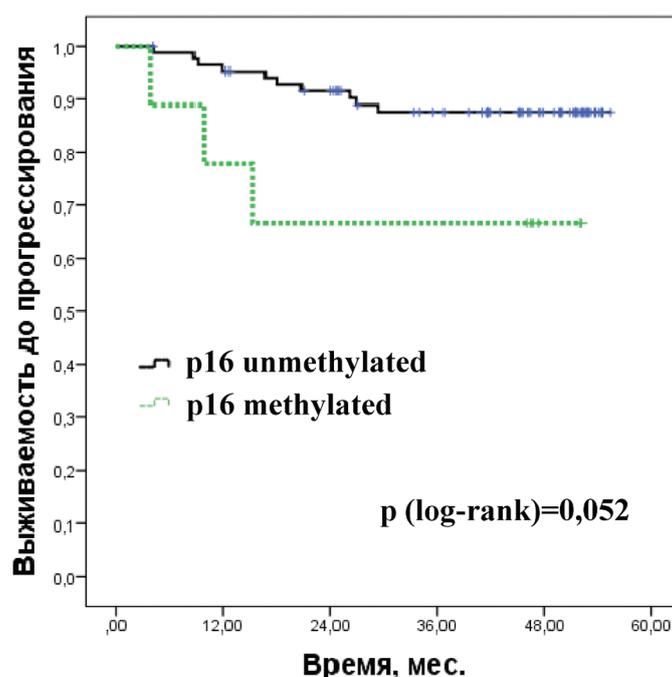
Рис. 4. Выживаемость до прогрессирования в зависимости от статуса метилирования гена *p16*Fig. 4. Progression-free survival depending on the *p16* gene methylation status

Таблица 5. Результаты моно- и многофакторного анализа выживаемости до прогрессирования опухоли
Table 5. Results of the univariate and multivariate survival analysis for prediction of tumor progression

Показатель	Монофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОР (95 % ДИ)	<i>p</i>	ОР (95 % ДИ)	<i>p</i>
Пол (М против Ж)	2,28 (0,51–10,29)	0,28	–	
Возраст (≥ 70 против < 70), лет	2,41 (0,79–7,37)	0,1	4,89 (1,42–16,91)	0,012
Рецидивная опухоль против первичной	8,58 (2,64–27,89)	$< 0,001$	13,59 (3,69–50,0)	$< 0,001$
Единичная опухоль против мультифокальной	0,62 (0,17–2,24)	0,46	–	
Размер (≥ 3 см против < 3 см)	0,15 (0,02–1,17)	0,07	–	
T1 против Ta	1,16 (0,26–5,24)	0,85	–	
High grade против low grade	2,5 (0,84–7,43)	0,1	5,07 (1,37–18,74)	0,015
Метилирование гена <i>p16</i>	3,34 (0,92–12,15)	0,067	6,84 (1,57–29,86)	0,011
Метилирование гена <i>TIMP3</i>	0,04 (0–297,59)	0,48	–	

Относительно прогностической значимости метилирования *TIMP3* результаты многочисленных исследований неоднозначны. В более ранней работе Friedrich с соавт. [25] установлена статистически значимая ассоциация эпигенетических изменений с лучшей безрецидивной выживаемостью. В то же время исследования Garcia-Vaquero с соавт. [10] и Hoque с соавт. [14] показали независимое влияние аномального метилирования *TIMP3* на снижение общей и онкоспецифической выживаемости пациентов. В работах Yates с соавт. и Casadio с соавт. [33, 34], так же как и в наших исследованиях, прогностическое значение эпигенетических изменений этого гена не установлено. Вместе с тем обращает на себя внимание 100 %-ная 3-летняя скорректированная выживаемость и выживаемость до прогрессирования у пациентов с РМП БМИ при наличии метилирования гена *TIMP3*.

Заключение. Таким образом, нами установлена относительно невысокая частота эпигенетических изменений *CDKN2A* и *TIMP3* в опухолевой ткани мочевого пузыря пациентов всех групп независимо от клинико-морфологических параметров. В то время как эпигенетические изменения *p14ARF* не выявлены ни в одном случае, аномальное метилирование генов *p16* и *TIMP3* наблюдалось с частотой 11,4 и 10,8 % соответственно. У пациентов с немышечно-инвазивными карциномами обнаружена статистически значимая связь метилирования генов *p16* и *TIMP3* с курением, что указывает на возможное влияние канцерогенов табачного дыма на возникновение данных эпигенетических нарушений. Анализ прогностического значения эпигенетической изменчивости изученных генов показал, что гиперметилирование *p16* является независимым фактором риска прогрессирования РМП БМИ (ОР 6,84; 95 % ДИ 1,6–29,9; $p = 0,011$).

Ввиду потенциальной обратимости эпигенетические изменения, в отличие от структурных нарушений генов, представляются привлекательными мишенями для противораковой терапии. Восстановление функции гена возможно за счет использования деметилирующих агентов, которые уже сейчас применяются для лечения острой лейкемии и миелодисплазии [35]. Особую актуальность восстановление профиля метилирования приобретает в связи с выявленной в настоящем исследовании статистически значимой связью эпигенетических изменений гена *p16* с прогрессированием РМП БМИ. Применение ингибиторов метилирования будет способствовать реактивации гена-онкосупрессора *p16*, являющегося критичным для нормального функционирования клетки.

Использование данных о статусе метилирования гена *p16* в комплексе с ранее выявленными молекулярными маркерами прогрессирования РМП [36, 37] позволит более точно стратифицировать пациентов на группы риска, определять частоту и степень мониторинга за пациентами, а также оценивать необходимость более агрессивной терапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (№ договора M16K-017).

Acknowledgements. This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Agreement no. M16K-017).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Океанов, А. Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2004–2013) / А. Е. Океанов, П. И. Моисеев, Л. Ф. Левин. – Минск : Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии, 2014. – 382 с.
2. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials / R. J. Sylvester [et al.] // *Eur. Urol.* – 2006. – Vol. 49, N 3. – P. 466–477. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.12.031>
3. Esteller, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome / M. Esteller // *Human Mol. Genetics.* – 2007. – Vol. 16, N R1. – P. R50–R59. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm018>
4. Jones, P. A. The epigenomics of cancer / P. A. Jones, S. B. Baylin // *Cell.* – 2007. – Vol. 128, N 4. – P. 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>
5. Enokida, H. Epigenetics in bladder cancer / H. Enokida, M. Nakagawa // *Intern. J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 13, N 4. – P. 298–307. <https://doi.org/10.1007/s10147-008-0811-1>
6. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma / A. Neuhausen [et al.] // *Cancer Biol. Ther.* – 2006. – Vol. 5, N 8. – P. 993–1001.
7. Phe, V. Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract / V. Phé, O. Cussenot, M. Rouprêt // *BJU Intern.* – 2009. – Vol. 104, N 7. – P. 896–901. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08696.x>
8. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors / G. Dominguez [et al.] // *Mutation Res./Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2003. – Vol. 530, N 1–2. – P. 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00133-7)
9. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma / J. W. Catto [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23, N 13. – P. 2903–2910. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.163>
10. Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors / R. García-Baquero [et al.] // *Tumour Biology.* – 2014. – Vol. 35, N 6. – P. 5777–5786. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1767-6>
11. p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review / A. Al-Kaabi [et al.] // *Disease Markers.* – 2014. – Vol. 2014. – Art. 260549. <https://doi.org/10.1155/2014/260549>
12. Kopnin, B. P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis / B. P. Kopnin // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 65, N 1. – P. 2–27.
13. Mitra, A. P. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer / A. P. Mitra, R. J. Cote // *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* – 2009. – Vol. 4, N 1. – P. 251–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092230>
14. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer / M. O. Hoque [et al.] // *J. Urol.* – 2008. – Vol. 179, N 2. – P. 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.09.019>
15. Prognostic significance of epigenetic inactivation of p16, p15, MGMT and DAPK genes in follicular lymphoma / M. Krajnović [et al.] // *Med. Oncol.* – 2013. – Vol. 30, N 1. – P. 441. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0441-3>
16. Peng, D. The relationship between P16 gene promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis based on Chinese patients / D. Peng, H. Zhang, G. Sun // *J. Cancer Res. Ther.* – 2014. – Vol. 10, N 8, suppl. – P. C292–C295. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.151535>
17. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma / A. K. El-Naggar [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1997. – Vol. 151, N 6. – P. 1767–1774.
18. Promoter methylation of MLH1, PMS2, MSH2 and p16 is a phenomenon of advanced-stage HCCs / I. Hinrichsen [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, N 1. – P. e84453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084453>
19. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma / J. Wang [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention.* – 2008. – Vol. 17, N 1. – P. 118–125. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0733>
20. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers / K. E. Bachman [et al.] // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59, N 4. – P. 798–802.
21. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers / S. Zöchbauer-Müller [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61, N 1. – P. 249–255.
22. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events / R. R. Serizawa [et al.] // *Intern. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 129, N 1. – P. 78–87. <https://doi.org/10.1002/ijc.25651>
23. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection / M. O. Hoque [et al.] // *JNCI: J. Natl. Cancer Inst.* – 2006. – Vol. 98, N 14. – P. 996–1004. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj265>
24. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients / M. G. Friedrich [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10, N 22. – P. 7457–7465. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0930>
25. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma / M. G. Friedrich [et al.] // *Eur. J. of Cancer.* – 2005. – Vol. 41, N 17. – P. 2769–2778. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.07.019>
26. Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumors. Association with recurrence / I. Orlov [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1999. – Vol. 155, N 1. – P. 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65105-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65105-X)
27. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer / K. Kawamoto [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 339, N 3. – P. 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.072>
28. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma / J. N. Weinstein [et al.] // *Nature.* – 2014. – Vol. 507, N 7492. – P. 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>

29. The relationship between promoter methylation of p16 gene and bladder cancer risk: a meta-analysis / D. Qi [et al.] // Intern. J. Clin. Exp. Med. – 2015. – Vol. 8, N 11. – P. 20701–20711.
30. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer / C. J. Marsit [et al.] // Carcinogenesis. – 2006. – Vol. 27, N 1. – P. 112–116. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi172>
31. Molecular classification of non-muscle-invasive bladder cancer (pTa low-grade, pT1 low-grade, and pT1 high-grade subgroups) using methylation of tumor-suppressor genes / R. Sacristan [et al.] // J. Mol. Diagn. – 2014. – Vol. 16, N 5. – P. 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.04.007>
32. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours / M. Agundez [et al.] // Eur. Urol. – 2011. – Vol. 60, N 1. – P. 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.04.020>
33. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer / D. R. Yates [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2007. – Vol. 13, N 7. – P. 2046–2053. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2476>
34. DNA Methylation profiles as predictors of recurrence in non muscle invasive bladder cancer: an MS-MLPA approach / V. Casadio [et al.] // J. Exp. Clin. Cancer Res. – 2013. – Vol. 32. – P. 94. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-94>
35. Worm, J. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy / J. Worm, P. Guldborg // J. Oral Pathol. Med. – 2002. – Vol. 31, N 8. – P. 443–449. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2002.00034.x>
36. Метилирование гена RUNX3 как фактор прогноза при раке мочевого пузыря без мышечной инвазии / М. П. Смаль [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 5. – С. 85–90.
37. Мутации гена TP53 и их прогностическая значимость при раке мочевого пузыря / М. П. Смаль [и др.] // Молекуляр. медицина. – 2015. – № 6. – С. 26–32.

References

1. Okeanov A. E., Moiseev P. I., Levin L. F. *Statistics of cancer diseases in the Republic of Belarus (2004–2013)*. Minsk, Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology, 2014. 382 p. (in Russian).
2. Sylvester R. J., van der Meijden A. P., Oosterlinck W., Witjes J. A., Bouffieux C., Denis L., Newling D. W., Kurth K. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European Urology*, 2006, vol. 49, no. 3, pp. 466–477. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.12.031>
3. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics*, 2007, vol. 16, no. R1, pp. R50–R59. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm018>
4. Jones P. A., Baylin S. B. The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007, vol. 128, no. 4, pp. 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>
5. Enokida H., Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 2008, vol. 13, no. 4, pp. 298–307. <https://doi.org/10.1007/s10147-008-0811-1>
6. Neuhausen A., Florl A. R., Grimm M. O., Schulz W. A. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biology and Therapy*, 2006, vol. 5, no. 8, pp. 993–1001.
7. Phé V., Cussenot O., Rouprêt M. Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU International*, 2009, vol. 104, no. 7, pp. 896–901. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08696.x>
8. Dominguez G., Silva J., Garcia J. M., Silva J. M., Rodriguez R., Muñoz C., Chacón I., Sanchez R., Carballido J., Colás A., España P., Bonilla F. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003, vol. 530, no. 1–2, pp. 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00133-7)
9. Catto J. W., Azzouzi A. R., Rehman I., Feeley K. M., Cross S. S., Amira N., Fromont G., Sibony M., Cussenot O., Meuth M., Hamdy F. C. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, vol. 23, no. 13, pp. 2903–2910. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.163>
10. García-Baquero R., Puerta P., Beltran M., Alvarez-Mújica M., Alvarez-Ossorio J. L., Sánchez-Carbayo M. Methylation of tumor suppressor genes in a novel panel predicts clinical outcome in paraffin-embedded bladder tumors. *Tumor Biology*, 2014, vol. 35, no. 6, pp. 5777–5786. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1767-6>
11. Al-Kaabi A., van Bockel L. W., Pothen A. J., Willems S. M. *p16INK4A and p14ARF* gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Disease Markers*, 2014, vol. 2014, art. 260549. <https://doi.org/10.1155/2014/260549>
12. Kopnin B. P. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry*, 2000, vol. 65, no. 1, pp. 2–27.
13. Mitra A. P., Cote R. J. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2009, vol. 4, no. 1, pp. 251–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092230>
14. Hoque M. O., Begum S., Brait M., Jeronimo C., Zahurak M., Ostrow K. L., Rosenbaum E., Trock B., Westra W. H., Schoenberg M., Goodman S. N., Sidransky D. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 promoter methylation is an independent prognostic factor for bladder cancer. *Journal of Urology*, 2008, vol. 179, no. 2, pp. 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.09.019>
15. Krajnović M., Radojković M., Davidović R., Dimitrijević B., Krtolica K. Prognostic significance of epigenetic inactivation of p16, p15, MGMT and DAPK genes in follicular lymphoma. *Medical Oncology*, 2013, vol. 30, no. 1, pp. 441. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0441-3>

16. Peng D., Zhang H., Sun G. The relationship between P16 gene promoter methylation and gastric cancer: a meta-analysis based on Chinese patients. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2014, vol. 10, no. 8, suppl., pp. C292–C295. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.151535>
17. El-Naggar A. K., Lai S., Clayman G., Lee J. K., Luna M. A., Goepfert H., Batsakis J. G. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *American Journal of Pathology*, 1997, vol. 151, no. 6, pp. 1767–1774.
18. Hinrichsen I., Kemp M., Peveling-Oberhag J., Passmann S., Plotz G., Zeuzem S., Brieger A. Promoter methylation of MLH1, PMS2, MSH2 and p16 is a phenomenon of advanced-stage HCCs. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 1, p. e84453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084453>
19. Wang J., Sasco A. J., Fu C., Xue H., Guo G., Hua Z., Zhou Q., Jiang Q., Xu B. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 2008, vol. 17, no. 1, pp. 118–125. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0733>
20. Bachman K. E., Herman J. G., Corn P. G., Merlo A., Costello J. F., Cavenee W. K., Baylin S. B., Graff J. R. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, no. 4, pp. 798–802.
21. Zöchbauer-Müller S., Fong K. M., Virmani A. K., Geradts J., Gazdar A. F., Minna J. D. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Research*, 2001, vol. 61, no. 1, pp. 249–255.
22. Serizawa R. R., Ralfkiaer U., Steven K., Lam G. W., Schmiedel S., Schüz J., Hansen A. B., Horn T., Guldborg P. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *International Journal of Cancer*, 2011, vol. 129, no. 1, pp. 78–87. <https://doi.org/10.1002/ijc.25651>
23. Hoque M. O., Begum S., Topaloglu O., Chatterjee A., Rosenbaum E., Van Criekinge W., Westra W. H., Schoenberg M., Zahurak M., Goodman S. N., Sidransky D. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2006, vol. 98, no. 14, pp. 996–1004. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj265>
24. Friedrich M. G., Weisenberger D. J., Cheng J. C., Chandrasoma S., Siegmund K. D., Gonzalgo M. L., Toma M. I., Huland H., Yoo C., Tsai Y. C., Nichols P. W., Bochner B. H., Jones P. A., Liang G. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 2004, vol. 10, no. 22, pp. 7457–7465. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0930>
25. Friedrich M. G., Chandrasoma S., Siegmund K. D., Weisenberger D. J., Cheng J. C., Toma M. I., Huland H., Jones P. A., Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *European Journal of Cancer*, 2005, vol. 41, no. 17, pp. 2769–2778. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.07.019>
26. Orlow I., LaRue H., Osman I., Lacombe L., Moore L., Rabbani F., Meyer F., Fradet Y., Cordon-Cardo C. Deletions of the *INK4A* gene in superficial bladder tumors. Association with recurrence. *American Journal of Pathology*, 1999, vol. 155, no. 1, pp. 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65105-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65105-X)
27. Kawamoto K., Enokida H., Gotanda T., Kubo H., Nishiyama K., Kawahara M., Nakagawa M. p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, vol. 339, no. 3, pp. 790–796. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.072>
28. Weinstein J. N., Akbani R., Broom B. M., Wang W., Verhaak R. G. W., McConkey D. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 2014, vol. 507, no. 7492, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>
29. Qi D., Li J., Jiang M., Liu C., Hu Y., Li M., Su J., Que B., Ji W. The relationship between promoter methylation of *p16* gene and bladder cancer risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, vol. 8, no. 11, pp. 20701–20711.
30. Marsit C. J., Karagas M. R., Danaee H., Liu M., Andrew A., Schned A., Nelson H. H., Kelsey K. T. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2006, vol. 27, no. 1, pp. 112–116. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgil72>
31. Sacristan R., Gonzalez C., Fernández-Gómez J. M., Fresno F., Escaf S., Sánchez-Carbayo M. Molecular classification of non-muscle-invasive bladder cancer (pTa low-grade, pT1 low-grade, and pT1 high-grade subgroups) using methylation of tumor-suppressor genes. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2014, vol. 16, no. 5, pp. 564–572. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.04.007>
32. Agundez M., Grau L., Palou J., Algaba F., Villavicencio H., Sanchez-Carbayo M. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *European Urology*, 2011, vol. 60, no. 1, pp. 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.04.020>
33. Yates D. R., Rehman I., Abbod M. F., Meuth M., Cross S. S., Linkens D. A., Hamdy F. C., Catto J. W. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 2007, vol. 13, no. 7, pp. 2046–2053. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2476>
34. Casadio V., Molinari C., Calistri D., Tebaldi M., Gunelli R., Serra L., Falcini F., Zingaretti C., Silvestrini R., Amadori D., Zoli W. DNA methylation profiles as predictors of recurrence in non muscle invasive bladder cancer: an MS-MLPA approach. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2013, vol. 32, pp. 94. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-94>
35. Worm J., Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 2002, vol. 31, no. 8, pp. 443–449. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2002.00034.x>
36. Smal' M. P., Rolevich A. I., Nabebina T. I., Krasny S. A., Goncharova R. I. *RUNX3* gene methylation status as a prognostic factor in non-muscle-invasive bladder cancer. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 85–90 (in Russian).
37. Smal' M. P., Rolevich A. I., Nabebina T. I., Krasny S. A., Goncharova R. I. *TP53* gene mutations and their prognostic significance in bladder cancer. *Molekulyarnaya meditsina [Molecular medicine]*, 2015, no. 6, pp. 26–32 (in Russian).

Информация об авторах

Смаль Маргарита Петровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: marharyta.smal@gmail.com

Никитченко Наталья Васильевна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: N.Nikitichenko@igc.by

Ролевич Александр Игоревич – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, агр. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: alexander.rolevich@gmail.com

Набеева Татьяна Ивановна – канд. мед. наук, врач патогистологической лаборатории. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, агр. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: nabebina.t@yandex.by

Красный Сергей Анатольевич – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заместитель директора. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, агр. Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: sergeykrasny@tut.by

Гончарова Роза Иосифовна – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: R.Goncharova@igc.by

Information about the authors

Marharyta P. Smal – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: marharyta.smal@gmail.com

Nataliya V. Nikitchenko – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: N.Nikitichenko@igc.by

Alexander I. Rolevich – Ph. D. (Med.), Leading researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: alexander.rolevich@gmail.com

Tatiana I. Nabebina – Ph. D. (Med.), pathohistologist. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: nabebina.t@yandex.by

Sergei A. Krasny – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Deputy Director. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: sergeykrasny@tut.by

Roza I. Goncharova – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: R.Goncharova@igc.by