

БИОЛОГИЯ**BIOLOGY**

УДК 577.21:575.174.015.3

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-300-306>

Поступило в редакцию 15.06.2023

Received 15.06.2023

**Е. П. Михаленко¹, А. Н. Щаюк¹, Т. В. Никитинская¹, Ю. В. Полюхович¹,
С. В. Кубрак¹, М. Н. Шепетько², академик А. В. Кильчевский¹**

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ
ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* И *UNCX*
У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

Аннотация. Целью данного исследования было определение статуса метилирования промоторных областей генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* в опухолевой и неопухолевой ткани легкого у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Относительный уровень метилирования промоторных областей генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, *UNCX* определяли методом количественной метилспецифической ПЦР у 73 пациентов с НМРЛ. Количественная метилспецифическая реакция проводилась как для образцов опухолевой ткани, так и для образцов неопухолевой ткани одного и того же пациента. Для каждого из образцов ставили реакцию по изучаемым генам (*MARCH11*, *UNCX*, *HOXA9*, *PTGDR*) и по референсному гену бета-актина (β -actin). Установлены положительные уровни метилирования гена *HOXA9* у 83,5 % пациентов, гена *MARCH11* – у 80,8 % пациентов, гена *PTGDR* – у 68,4 % пациентов, гена *UNCX* – у 84,9 % пациентов. В исследуемой группе пациентов с НМРЛ выявлены достоверные различия относительных уровней метилирования промоторных регионов генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* в опухолевой и неопухолевой ткани легкого. Эти данные позволяют предположить, что гиперметилирование генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* может играть роль в опухолевой прогрессии НМРЛ.

Ключевые слова: эпигенетика, количественная метилспецифическая реакция, относительный уровень метилирования, немелкоклеточный рак легкого, опухолевая и неопухолевая ткань

Для цитирования. Определение статуса метилирования промоторных областей генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* у пациентов с немелкоклеточным раком легкого / Е. П. Михаленко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 4. – С. 300–306. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-300-306>

**Alena P. Mikhalenka¹, Anna N. Shchayuk¹, Tatsiana V. Nikitinskaya¹, Yuliya V. Paliukhovich¹,
Sviatlana V. Kubrak¹, Michail N. Shapetska², Academician Aleksandr V. Kilchevsky¹**

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

²Belarusian Medical University, Minsk, Republic of Belarus

**DETERMINING THE METHYLATION STATUS OF THE PROMOTER REGIONS OF *MARCH11*, *HOXA9*,
PTGDR, AND *UNCX* GENES IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

Abstract. The aim of this study was to determine the methylation status of the promoter regions of *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, and *UNCX* genes in the tumor and non-tumor lung tissue in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). A relative level of methylation of the promoter regions of *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, and *UNCX* genes was determined by the quantitative methylation-specific PCR in 73 patients with NSCLC. The quantitative methylation-specific reaction was performed both for tumor tissue samples and non-tumor tissue samples of the same patient. For each of the samples, a reaction was set both by the investigated genes (*MARCH11*, *UNCX*, *HOXA9*, and *PTGDR*) and by the reference beta-actin gene (β -actin). Positive levels of methylation of the *HOXA9* gene were established for 83.5 % patients; the *MARCH11* gene – for 80.8 % patients; the *PTGDR* gene – for 68.4 % patients; the *UNCX* gene – for 84.9 % patients. In the study group of patients with NSCLC, significant differences were found in the relative levels of methylation of the promoter regions of *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, and *UNCX* genes in the tumor and non-tumor lung tissue. The data suggest that hypermethylation of *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, and *UNCX* genes may play a role in NSCLC tumor progression.

Keywords: epigenetics, quantitative methyl-specific reaction, relative methylation level, non-small cell lung cancer, tumor and non-tumor tissue

For citation. Mikhalenka A. P., Shchayuk A. N., Nikitinskaya T. V., Paliukhovich Yu. V., Kubrak S. V., Shapetska M. N., Kilchevsky A. V. Determining the methylation status of the promoter regions of *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, and *UNCX* genes in patients with non-small cell lung cancer. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2023, vol. 67, no. 4, pp. 300–306 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-300-306>

Введение. Эпигенетические механизмы, которые включают метилирование ДНК, модификацию гистонов и микроРНК (миРНК), могут вызывать наследуемые фенотипические изменения экспрессии генов без изменения их нуклеотидной последовательности. Эти эпигенетические модификации широко вовлечены в физиологические и патологические процессы, включая развитие онкологических заболеваний [1].

Метилирование ДНК является одним из наиболее распространенных эпигенетических изменений и играет важную роль в модуляции структуры хроматина, регуляции транскрипции и стабильности генома. Равновесие между всеми ферментами и факторами, вовлеченными в метилирование ДНК, и способ его реализации являются ключевыми для нормального поведения клетки. Изменение этого равновесия приводит к активации или ингибированию различных биологических событий, в том числе изменению пролиферации и метаболизма клетки [2; 3]. Метилирование ДНК у людей отмечают едва ли не исключительно в CpG-динуклеотидах, большинство CpG-последовательностей в геноме метилированы. Изменение метилирования CpG-островков ДНК является одним из молекулярных процессов, обеспечивающих развитие опухоли [1]. Аберрантное метилирование ДНК в CpG-островках в промоторной области начинается на ранних стадиях онкогенеза, что указывает на его потенциал в качестве биомаркера для обнаружения рака [4; 5]. Наиболее яркими проявлениями этого процесса являются гиперметилирование промоторов опухолевых супрессоров и деметилирование промоторов онкогенов [6]. Известно, что метилирование ДНК изменяется не только в опухолевых клетках, но и в гистологически нормальной ткани, что может способствовать уточнению диагноза при исследовании биопсийных образцов [7].

Успехи эпигенетики способствуют разработке методов диагностики злокачественных заболеваний на ранних стадиях. Количественная метилспецифическая ПЦР (Q-MSP) – наиболее часто используемый и хорошо зарекомендовавший себя метод обнаружения метилирования ДНК. Этот метод является простым и экономичным, позволяет обнаруживать мельчайшие очаги опухолевых клеток. Большинство исследований сфокусировано на обнаружении эпигенетических изменений с использованием метода метилспецифической ПЦР как для ранней диагностики онкозаболеваний, так и для определения метастазирования и прогноза течения онкологического процесса [8–10].

Целью нашего исследования было определение статуса метилирования промоторных областей генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* в опухолевой и неопухолевой ткани легкого у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Материалы и методы исследования. Уровень метилирования промоторных областей генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, *UNCX* определяли методом количественной метилспецифической ПЦР у 73 пациентов с НМРЛ, проходивших лечение в УЗ «Минский городской клинический онкологический центр». Исследование было одобрено этическим комитетом, и пациенты подписали информированное согласие на участие.

Средний возраст пациентов составил 62,2 года (от 39 до 92 лет), по гендерному соотношению в выборку вошли 20 женщин (27,4 %) и 53 мужчины (72,6 %). 37 пациентов (50,7 %) имели аденокарциному, 36 (49,3 %) – плоскоклеточный рак легкого. Статус курения у 4 пациентов (5,5 %) неизвестен, 43 человека (58,9 %) курящих и 26 (35,6 %) – некурящих. По стадиям заболевания исследуемая выборка распределилась следующим образом: I стадия – 32 человека (43,8 %), II – 15 человек (20,5 %), III – 23 (31,5 %) и IV – 3 человека (4,1 %).

Выделение ДНК из замороженных опухолевой и неопухолевой тканей легкого производили с использованием стандартного протокола экстракции фенол-хлороформным методом. Далее

геномная ДНК подвергалась бисульфитной конверсии с помощью наборов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Fisher Scientific) и MethylEdge™ Bisulfite Conversion System (Promega). Масса исходной ДНК, подвергшейся конверсии, составляла 500 нг для каждого образца. Объем использованного для элюирования ДНК буфера – 20 мкл (максимальный, рекомендованный производителем).

Праймеры и зонды для ПЦР, специфичные для метилирования, были синтезированы в ОДО «Праймтех» (Беларусь). Валидацию последовательностей подобранных праймеров проводили в онлайн-программе PrimerBlast NCBI. Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1. Реакционная смесь включала 1 мкл бисульфит-модифицированной ДНК и 7 мкл ПЦР-смеси, состоящей из 2-кратного премикса для ПЦР-РВ, прямого праймера (10 мкМ), обратного праймера (10 мкМ) и зонда (10 мкМ). Протокол ПЦР-амплификации: 95 °С – 3 мин, 40 циклов (95 °С – 10 с, 55 °С – 30 с). В качестве отрицательного контроля использовали воду без матрицы ДНК. Реакции амплификации проводили в системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения CFX Maestro Software Version 4.1.2433.1219 (Bio-Rad).

Т а б л и ц а 1. Праймеры и зонды, используемые для количественной метилспецифической ПЦР [8]

Table 1. The sequences of the primer and the fluorescent probe used in this study [8]

Ген Gene	Последовательность прямого праймера Forward primer 5'→3'	Последовательность флуоресцентного зонда Fluorescent probe sequence 5'→3'	Последовательность обратного праймера Reverse primer 5'→3'
MARCH11	TTTTTTAGTTTACGAGAGTCG-TAGC	FAM-CGTCGTTTGGAGAGGGGT-TATTCGT-TAMRA	GAATCAATAAAACGAAAT-TCGAA
UNCX	ACGGTTCGTTTTTGGGAATA-TTC	FAM-GGCGGCGTGGTGGGTTTT-TTTTATTC-TAMRA	GACCGACTACAATAATACCCGA
HOXA9	AATAAATTTATCGTAGAG-CGGTAC	FAM-GCGCCCCATTAACCGTACGCGT-TAMRA	CATATAACAATAATAACACCCGAA
PTGDR	TTGTTTCGCGTTTTTAATGT-TAGC	FAM-CACGACAAAACCTCCTAT-TAMRA	AAAAAACTCCGAAAACGACGAAAT
β-actin	TGGTGATGGAGGAGGTTTAG-TAAGT	FAM-ACCACCACCCAACACACA-ATAACAAACACA-TAMRA	AACCAATAAAACCTACTCC-TCCCTAA

Количественная метилспецифическая реакция проводилась как для образцов опухолевой ткани, так и для образцов неопухолевой ткани одного и того же пациента. Для каждого из образцов ставили реакцию по изучаемым генам (*MARCH11*, *UNCX*, *HOXA9*, *PTGDR*) и по референсному гену бета-актина (β -actin).

Для интерпретации полученных результатов высчитывается относительный уровень метилирования (ОУМ, TaqMeth V). Для этого значение финального уровня флуоресценции изучаемого гена (RFU_x) делится на значение финального уровня флуоресценции референсного гена ($RFU_{\beta\text{-actin}}$) и умножается на 100.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica 10. В исследовании применены непараметрические методы: для сравнения зависимых выборок (значения для опухолевой и неопухолевой ткани одного и того же пациента) по количественным признакам использовался *W*-критерий Вилкоксона. За критический уровень статистической значимости принимали вероятность безошибочного прогноза, равную 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. В исследовании установлены положительные уровни метилирования гена *HOXA9* для 61 (83,5 %) пациента из 73, гена *MARCH11* – для 59 (80,8 %) пациентов, гена *PTGDR* – для 50 (68,4 %) пациентов, гена *UNCX* – для 62 (84,9 %) пациентов. Эти данные были использованы для дальнейшего анализа. На первом этапе были проанализированы средние уровни метилирования промоторных регионов генов *HOXA9* (гомеобокс A9), *MARCH11* (убиквитинлигаза), *PTGDR* (рецептор простагландина D2) и *UNCX* (гомеобокс UNC). В табл. 2 представлены основные статистические данные анализа статуса метилирования изучаемых генов.

Таблица 2. Относительный уровень метилирования четырех отдельных маркеров в опухолевых очагах и неопухолевой ткани пациентов с НМРЛ

Table 2. Relative methylation levels of four individual markers in tumor and non-tumor tissue of patients with NSCLC

Параметр Parameter	Ген Gene							
	<i>HOXA9</i>		<i>MARCH11</i>		<i>UNCX</i>		<i>PTGDR</i>	
Тип ткани	Опухоль	Норма	Опухоль	Норма	Опухоль	Норма	Опухоль	Норма
Количество образцов	61	61	59	59	62	62	50	50
Среднее	97,60	49,63	43,04	26,95	52,99	35,37	47,13	23,42
Стандартное отклонение	40,72	37,89	19,36	13,90	34,87	17,05	36,28	25,38
Медиана	107,58	44,02	48,49	30,47	46,66	35,61	37,78	13,07
Минимум	18,49	0,43	0,73	0,44	5,03	0,58	1,58	0,01
25 перцентиль	71,11	27,62	27,06	17,39	22,83	23,50	19,40	8,20
75 перцентиль	127,90	61,46	54,90	36,95	78,48	43,11	63,33	31,29
Максимум	167,68	273,01	82,66	59,06	172,54	82,05	139,49	99,56
<i>p</i> -value	$4,89 \cdot 10^{-8}$		$2,67 \cdot 10^{-6}$		$2,70 \cdot 10^{-4}$		$7,38 \cdot 10^{-8}$	
<i>W</i> -критерий Вилкоксона	5,46		4,69		3,64		5,38	

Примечание: *p*-value для *W*-критерия Вилкоксона.

Note: *p*-value for Wilcoxon test.

Среднее значение ОУМ гена *HOXA9* в опухолевой ткани было $97,6 \pm 41$, в то время как среднее значение ОУМ в неопухолевой ткани легкого – $49,6 \pm 38$. Среднее значение ОУМ гена *MARCH11* в опухолевой ткани составило $43,04 \pm 19$, среднее значение ОУМ в неопухолевой ткани легкого – 27 ± 14 . Необходимо отметить, что относительные уровни метилирования гена *MARCH11* значительно ниже, чем для гена *HOXA9*. Среднее значение ОУМ гена *UNCX* в опухолевой ткани составило 53 ± 35 , а среднее значение ОУМ в неопухолевой ткани легкого – 35 ± 17 . Среднее значение ОУМ гена *PTGDR* в опухолевой ткани составило 47 ± 36 , а среднее значение ОУМ в неопухолевой ткани легкого – $23,4 \pm 25$. Для гена *HOXA9* в 52 из 61 случая (85,2 %) метилирование в опухоли было больше, чем в соответствующей неопухолевой ткани, для гена *MARCH11* – в 47 из 59 случаев (79,7 %), *PTGDR* – в 41 из 50 случаев (82,0 %), *UNCX* – в 45 из 62 случаев (72,6 %).

Статистическая обработка полученных результатов показала достоверное отличие относительного уровня метилирования между опухолевой и неопухолевой тканью пациентов с НМРЛ для всех исследуемых генов.

Известно, что все протестированные нами гены функционально связаны с онкогенезом. Ген *MARCH11* кодирует убиквитинлигазу, которая добавляет убиквитин к лизину в целевом субстратном белке, и таким образом сигнализирует о его внутриклеточном транспорте и передаче сигналов внутри клетки, что играет важную роль при онкогенезе [8]. Ген *PTGDR* кодирует один из вариантов рецепторов, связанных с гуанин-нуклеотид-связывающим белком (G-белок), и относится к трансмембранным белкам, которые реагируют на внеклеточные сигналы и активируют внутриклеточные сигнальные пути. Метилирование промотора *PTGDR* связано с развитием колоректального рака и НМРЛ [8; 11; 12].

UNCX и *HOXA9* принадлежат к эволюционно консервативным суперсемействам гомеобоксов, которые играют решающую роль в регуляции апоптоза, дифференцировки и ангиогенеза. Белок, кодируемый геном *UNCX*, является фактором транскрипции, хотя молекулярные механизмы, лежащие в основе активации *UNCX*, и его роль в пролиферации и дифференцировке еще до конца не ясны. Недавно было описано влияние эпигенетической модификации *UNCX* на развитие острого миелоидного лейкоза [13].

Ген *HOXA9* является одним из представителей гомеобокса (*HOX*). Большое количество исследований показало, что гены *HOX* имеют существенное значение в прогрессировании различных

заболеваний, абберрантно экспрессируются в опухолях и участвуют в опухолевом генезе [14]. Прогностическая роль метилирования *HOXA9* при солидных злокачественных новообразованиях противоречива. Однако рядом исследователей выявлено, что повышенное метилирование *HOXA9* было связано со стадией заболевания и с низкой общей выживаемостью пациентов при некоторых онкозаболеваниях [8; 12; 14; 15]. Кроме того, как и в нашем исследовании, ряд авторов показали, что значения уровня метилирования *HOXA9* в опухолевых тканях в различных видах опухолей значительно возрастали по сравнению с соответствующими нормальными тканями [8].

Таким образом, в нашем исследовании выявлены достоверные различия в относительных уровнях метилирования промоторных регионов исследуемых генов в опухолевой и неопухолевой тканях у пациентов с НМРЛ. Эти данные позволяют предположить, что гиперметилирование генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* может играть роль в опухолевой прогрессии НМРЛ. В дальнейшем планируется провести анализ влияния метилирования ДНК на клинико-морфологические характеристики опухоли при немелкоклеточном раке легкого.

Заключение. В исследуемой группе пациентов с НМРЛ выявлены достоверные различия относительных уровней метилирования промоторных регионов генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR* и *UNCX* в опухолевой и неопухолевой ткани легкого. Наибольший относительный уровень метилирования в опухолевой ткани пациентов с НМРЛ зарегистрирован при анализе промоторного региона гена *HOXA9*. Известно, что ген *HOXA9* относится к суперсемейству генов, кодирующих белки НОХ, которые являются факторами транскрипции, участвующими в онкогенезе. Дальнейшие исследования метилирования ДНК будут способствовать лучшему пониманию механизмов, лежащих в основе развития рака легкого, и позволят предложить новые мишени для разработки схем лечения данного заболевания.

Список использованных источников

1. Zhang, L. Epigenetics in health and disease / L. Zhang, Q. Lu, C. Chang // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2020. – Vol. 1253. – P. 3–55. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1
2. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies / A. E. Jaffe [et al.] // *Int. J. Epidemiol.* – 2012. – Vol. 41, N 1. – P. 200–209. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr238>
3. A novel epigenetic signature for early diagnosis in lung cancer / A. Diaz-Lagares [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, N 13. – P. 3361–3371. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-2346>
4. Pan-cancer predictions of transcription factors mediating aberrant DNA methylation / D. Dettl [et al.] // *Epigenetics and Chromatin.* – 2022. – Vol. 15, N 1. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00443-w>
5. Fukushige, S. DNA methylation in cancer: a gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers / S. Fukushige, A. Horii // *Tohoku J. Exp. Med.* – 2013. – Vol. 229, N 3. – P. 173–185. <https://doi.org/10.1620/tjem.229.173>
6. Differentially methylated regions within lung cancer risk loci are enriched in deregulated enhancers / M. Laplana [et al.] // *Epigenetics.* – 2021. – Vol. 17, N 2. – P. 117–132. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1878723>
7. Methylation profiling defines an extensive field defect in histologically normal prostate tissues associated with prostate cancer / B. Yang [et al.] // *Neoplasia.* – 2013. – Vol. 15, N 4. – P. 399–408. <https://doi.org/10.1593/neo.13280>
8. A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non–Small Cell Lung Cancer and Serum DNA / A. Ooki [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 23, N 22. – P. 7141–7152. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1222>
9. Epigenome-wide scan identifies differentially methylated regions for lung cancer using pre-diagnostic peripheral blood / Naisi Zhao [et al.] // *Epigenetics.* – 2022. – Vol. 17, N 4. – P. 460–472. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1923615>
10. Methylation-associated inactivation of JPH3 and its effect on prognosis and cell biological function in HCC / Yi Huang [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2022. – Vol. 25, N 4. – Art. 124. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12640>
11. DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer / A. Kalmar [et al.] // *BMC Cancer.* – 2015. – Vol. 15, N 1. – Art. 736. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1687-x>
12. Pradhan, M. P. Systems biology approach to stage-wise characterization of epigenetic genes in lung adenocarcinoma / M. P. Pradhan, A. Desai, M. J. Palakal // *BMC Syst. Biol.* – 2013. – Vol. 7, N 1. – Art. 141. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-141>
13. Epigenetically induced ectopic expression of *UNCX* impairs the proliferation and differentiation of myeloid cells / G. Daniele [et al.] // *Haematologica.* – 2017. – Vol. 102, N 7. – P. 1204–1214. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.163022>
14. The prognostic value of homeobox A9 (*HOXA9*) methylation in solid tumors: a systematic review and meta-analysis / H. Cai [et al.] // *Transl. Cancer Res.* – 2021. – Vol. 10, N 10. – P. 4347–4354. <https://doi.org/10.21037/tcr-21-765>
15. Methylation of *HOXA9* and *ISL1* Predicts Patient Outcome in High-Grade Non-Invasive Bladder Cancer / M. O. Kitchen [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, N 9. – Art. e0137003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137003>

References

- Zhang L., Lu Q., Chang C. Epigenetics in health and disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, vol. 1253, pp. 3–55. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3449-2_1
- Jaffé A. E., Murakami P., Lee H., Leek J. T., Fallin M. D., Feinberg A. P., Irizarry R. A. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *International Journal of Epidemiology*, 2012, vol. 41, no. 1, pp. 200–209. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr238>
- Diaz-Lagares A., Mendez-Gonzalez J., Hervas D., Saigi M., Pajares M. J., Garcia D., Crujeiras A. B., Pio R., Montuenga L. M., Zulueta J., Nadal E., Rosell A., Esteller M., Sandoval J. A novel epigenetic signature for early diagnosis in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2016, vol. 22, no. 13, pp. 3361–3371. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-2346>
- Detilleux D., Spill Y. G., Balaramane D., Weber M., Bardet A. F. Pan-cancer predictions of transcription factors mediating aberrant DNA methylation. *Epigenetics and Chromatin*, 2022, vol. 15, no. 1. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00443-w>
- Fukushige S., Horii A. DNA methylation in cancer: a gene silencing mechanism and the clinical potential of its biomarkers. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2013, vol. 229, no. 3, pp. 173–185. <https://doi.org/10.1620/tjem.229.173>
- Laplana M., Bieg M., Faltus C., Melnik S., Bogatyrova O., Gu Z., Muley T., Meister M., Dienemann H., Herpel E., Amos C. I., Schlesner M., Eils R., Plass C., Risch A. Differentially methylated regions within lung cancer risk loci are enriched in deregulated enhancers. *Epigenetics*, 2021, vol. 17, no. 2, pp. 117–132. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1878723>
- Yang B., Bhusari S., Kueck J., Weeratunga P., Wagner J., Levenson G., Huang W., Jarrard D. F. Methylation profiling defines an extensive field defect in histologically normal prostate tissues associated with prostate cancer. *Neoplasia*, 2013, vol. 15, no. 4, pp. 399–408. <https://doi.org/10.1593/neo.13280>
- Ooki A., Maleki Z., Tsay J.-C. J., Goparaju Ch., Brait M., Turaga N., Nam H.-S., Rom W. N., Pass H. I., Sidransky D., Guerrero-Preston R., Hoque M. O. A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non-Small Cell Lung Cancer and Serum DNA. *Clinical Cancer Research*, 2017, vol. 23, no. 22, pp. 7141–7152. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-17-1222>
- Zhao N., Ruan M., Koestler D. C., Lu J., Marsit C. J., Kelsey K. T., Platz E. A., Michaud D. S. Epigenome-wide scan identifies differentially methylated regions for lung cancer using pre-diagnostic peripheral blood. *Epigenetics*, 2022, vol. 17, no. 4, pp. 460–472. <https://doi.org/10.1080/15592294.2021.1923615>
- Huang Yi, Yu Z., Zheng M., Yang X., Huang H., Zhao L. Methylation-associated inactivation of JPH3 and its effect on prognosis and cell biological function in HCC. *Molecular Medicine Reports*, 2022, vol. 25, no. 4, art. 124. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12640>
- Kalmár A., Péterfia B., Hollósi P., Galamb O., Spisák S., Wichmann B., Bodor A., Tóth K., Patai Á. V., Valcz G., Nagy Z. B., Kubák V., Tulassay Z., Kovalszky I., Molnár B. DNA hypermethylation and decreased mRNA expression of MAL, PRIMA1, PTGDR and SFRP1 in colorectal adenoma and cancer. *BioMed Central Cancer*, 2015, vol. 15, no. 1, art. 736. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1687-x>
- Pradhan M. P., Desai A., Palakal M. J. Systems biology approach to stage-wise characterization of epigenetic genes in lung adenocarcinoma. *BMC Systems Biology*, 2013, vol. 7, no. 1, art. 141. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-141>
- Daniele G., Simonetti G., Fusilli C., Iacobucci I., Lonocce A., Palazzo A., Lomiento M. [et al.]. Epigenetically induced ectopic expression of UNCX impairs the proliferation and differentiation of myeloid cells. *Haematologica*, 2017, vol. 102, no. 7, pp. 1204–1214. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.163022>
- Cai H., Ke Z. B., Dong R. N., Chen H., Lin F., Zheng W. C., Chen S. H., Zhu J. M., Chen S. M., Zheng Q. S., Wei Y., Xue X. Y., Xu N. The prognostic value of homeobox A9 (HOXA9) methylation in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Translation Cancer Research*, 2021, vol. 10, no. 10, pp. 4347–4354. <https://doi.org/10.21037/tcr-21-765>
- Kitchen M. O., Bryan R. T., Haworth K. E., Emes R. D., Luscombe Ch., Gommersall L., Cheng K. K., Zeegers M. P., James N. D., Devall A. J., Fryer A. A., Farrell W. E. Methylation of HOXA9 and ISL1 Predicts Patient Outcome in High-Grade Non-Invasive Bladder Cancer. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 9, art. e0137003. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137003>

Информация об авторах

Михаленко Елена Петровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Michalenko@igc.by.

Щаюк Анна Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna.shchayuk@tut.by.

Никитинская Татьяна Владимировна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: T.Nikitinskaya@igc.by.

Полухович Юлия Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yu.paliukhovich@igc.by.

Information about the authors

Mikhailenka Alena P. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Michalenko@igc.by.

Shchayuk Anna N. – Ph. D. (Biology), 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: anna.shchayuk@tut.by.

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

Paliukhovich Yuliya V. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str.,

Кубрак Светлана Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: S.Kubrak@igc.by.

Шепетько Михаил Николаевич – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shepetjko@gmail.com.

Кильчевский Александр Владимирович – академик, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kilchev@presidium.bas-net.by.

220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yu.paliukhovich@igc.by.

Kubrak Sviatlana V. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: S.Kubrak@igc.by.

Shapetska Michail N. – Ph. D. (Medicine), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shepetjko@gmail.com.

Kilchevsky Aleksandr V. – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Chief Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kilchev@presidium.bas-net.by.