

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК [575.224+575.23]:616.62-006

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-3-322-328>

Поступило в редакцию 10.05.2018

Received 10.05.2018

М. П. Смаль¹, Н. В. Никитченко¹, А. И. Ролевич², Т. И. Набеева²,
член-корреспондент С. А. Красный², Р. И. Гончарова¹

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

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

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА *p16* НА РИСК ПРОГРЕССИРОВАНИЯ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ БЕЗ МЫШЕЧНОЙ ИНВАЗИИ

Аннотация. Для более точного предсказания поведения опухоли и индивидуализации лечебного подхода необходима разработка новых методов прогноза клинического течения рака мочевого пузыря (РМП). В качестве перспективных прогностических маркеров рассматриваются мутационные и эпигенетические изменения генов, играющих ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза. В настоящем исследовании проведена оценка влияния метилирования промоторной области гена *p16* на риск рецидивирования, прогрессирования и неблагоприятного исхода заболевания на примере выборки из 158 пациентов с РМП. Эпигенетические изменения исследованного гена выявлены в 11,4 % уротелиальных карцином и не зависели от клинико-морфологических характеристик. Вместе с тем в подгруппе пациентов с немусечно-инвазивными опухолями аномальное метилирование *p16* статистически значимо связано с курением, а в подгруппе пациентов с мышечно-инвазивным РМП – с низкой степенью дифференцировки опухоли. В многофакторном регрессионном анализе пропорциональных рисков Кокса установлено, что гиперметилирование гена *p16* является независимым предиктором прогрессирования РМП без мышечной инвазии (отношение рисков 6,84; 95 % ДИ 1,6–29,9; $p = 0,011$). Применение данных об эпигенетической изменчивости гена *p16* позволит повысить точность прогноза клинического течения рака мочевого пузыря и подобрать адекватную тактику лечения.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, эпигенетические изменения, метилирование, *p16*, прогностическое значение

Для цитирования: Влияние метилирования гена *p16* на риск прогрессирования рака мочевого пузыря без мышечной инвазии / М. П. Смаль [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 3. – С. 322–328. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-3-322-328>

Marharyta P. Smal¹, Nataliya V. Nikitchenko¹, Alexander I. Rolevich², Tatiana I. Nabebina²,
Corresponding Member Sergei A. Krasny², Roza I. Goncharova¹

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

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

INFLUENCE OF *P16* GENE METHYLATION ON THE RISK OF PROGRESSION OF NON-MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER

Abstract. To accurately predict the tumor behavior and individualize the treatment approach, new methods for bladder cancer (BC) prognosis are required. The most promising prognostic markers are the mutational and epigenetic changes of genes involved in maintaining cellular homeostasis. In the present study, we evaluated the influence of *p16* promoter hypermethylation on the risk of recurrence, progression and disease outcome in the group of 158 BC patients. *p16* epigenetic changes were found in 11.4 % of urothelial carcinomas and did not depend on clinicomorphological characteristics. However, in the subgroup of patients with non-muscle invasive tumors, *p16* abnormal methylation was significantly associated with smoking, and in the subgroup of patients with muscle-invasive BC, it was linked to a high tumor grade (G3). 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, *p16*, prognostic value

For citation: Smal M. P., Nikitchenko N. V., Rolevich A. I., Nabebina T. I., Krasny S. A., Goncharova R. I. Influence of *p16* gene methylation on the risk of progression of non-muscle invasive bladder cancer. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 3, pp. 322–328 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-3-322-328>

Введение. Рак мочевого пузыря (РМП) занимает девятое место по частоте встречаемости в мире. В структуре всех онкологических заболеваний населения Республики Беларусь РМП составляет 2,7 %, причем отмечается тенденция к постоянному росту заболеваемости [1]. Выбор тактики лечения пациентов с РМП определяется комплексом клинических и патоморфологических параметров, результаты оценки которых характеризуются недостаточно высокой объективностью и воспроизводимостью. В связи с этим выявление молекулярно-генетических маркеров прогноза клинического течения РМП приобретает высокую актуальность.

Результаты многочисленных исследований последних лет показывают, что наряду со структурными изменениями генов, значительный вклад в возникновение и развитие злокачественных новообразований также вносят нарушения эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, наиболее изученным из которых является метилирование ДНК. Опухолевые клетки мочевого пузыря характеризуются глобальным гипометилированием и сайт-специфическим гиперметилированием CpG-островков в регуляторных областях генов, задействованных в поддержании клеточного гомеостаза [2].

Одним из таких генов является опухолевый супрессор *p16*, расположенный на хромосоме 9 (локус 9p21) и играющий ключевую роль в регуляции клеточного цикла. Белковый продукт этого гена препятствует образованию комплексов CDK4/cyclin D1, и, тем самым, задерживает Rb в дефосфорилированном состоянии, что не позволяет клетке вступить в S-фазу [3]. Гиперметилирование промоторной области гена *p16* обнаруживается в злокачественных новообразованиях различной локализации [4–6], приводит к снижению его экспрессии и транскрипционному сайленсингу [7]. В отношении рака мочевого пузыря данные о частоте и связи аномального метилирования гена *p16* с особенностями клинического течения заболевания противоречивы, а его прогностическая роль остается неясной, что определяет необходимость проведения настоящего исследования на примере пациентов с РМП, проживающих на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования. Группу исследования составили 158 пациентов (124 мужчины и 34 женщины) в возрасте от 38 до 88 лет (медиана – 68 лет) с гистологически верифицированным диагнозом РМП, проходивших лечение в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова в период с 2010 по 2014 г. Клинико-анамнестические данные пациентов представлены в табл. 1.

Выделение геномной ДНК проводили из свежего опухолевого материала согласно стандартному протоколу фенол-хлороформной экстракции.

Бисульфитную модификацию ДНК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) в соответствии с рекомендациями производителя. Статус метилирования промоторной области гена *p16* определяли с помощью метил-специфической ПЦР с праймерами, предложенными Zöchbauer-Müller и соавт. [8]. Реакционная смесь общим объемом 15 мкл содержала 100 нг бисульфит-конвертированной ДНК, 1х ПЦР буфер, 5 % ДМСО, 0,2 мкМ каждого праймера (Праймтех), 0,2 мМ dNTPs и 0,3 единицы активности Taq полимеразы (Праймтех). После 15-минутной инкубации при 95 °С проводили 40 циклов амплификации (денатурация при 99 °С – 1 с, отжиг при 65 °С и 62 °С – 10 с для выявления метилированной и неметилированной ДНК соответственно, элонгация при 72 °С – 10 с). Конечную элонгацию осуществляли в течение 2 мин при 72 °С. 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.). 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 определяли по методу Каплана–Мейера, значимость различий между показателями выживаемости оценивали 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

Т а б л и ц а 1. Характеристика группы исследования и частота метилирования гена *p16* в зависимости от демографических и клинических параметровT a b l e 1. Patient characteristics and the frequency of *p16* gene methylation depending on the demographic and clinical parameters

Характеристика Characteristic	Класс Class	Общее количество, <i>n</i> Total, <i>n</i>	Метилирование <i>p16</i> , <i>n</i> (%) Methylation <i>p16</i> , <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Пол	Мужской	124	17 (13,7)	0,12
	Женский	34	1 (2,9)	
Возраст	До 60 лет	36	5 (13,9)	0,56
	60 лет и более	122	13 (10,7)	
Категория T	Ta	17	1 (5,9)	0,88
	T1	86	10 (11,6)	
	T ≥ 2	55	7 (12,7)	
Наличие метастазов	Да	14	1 (7,1)	1,0
	Нет	144	17 (11,8)	
Размер опухоли	До 3 см	69	8 (11,6)	1,0
	3 см и более	89	10 (11,2)	
Степень дифференцировки (ВОЗ 1973)	G1	54	5 (9,3)	0,42
	G2	70	7 (9,7)	
	G3	33	6 (17,6)	
	Нет данных	1	–	
Степень дифференцировки (ВОЗ 2004)	PUNLMP / Low grade	88	11 (12,5)	0,80
	High grade	70	7 (10,0)	
Мультифокальность опухоли	Одиночная опухоль	55	6 (10,9)	1,0
	Множественная опухоль	103	12 (11,7)	
Макроскопический вид опухоли	Папиллярная	115	13 (11,3)	1,0
	Солидная/смешанная	43	5 (11,6)	
Статус курения	Не курит	46	2 (4,3)	0,062
	Курит/курил ранее	105	16 (15,2)	
	Нет данных	7	–	

П р и м е ч а н и е. PUNLMP (русск. ПУОНЗП) – папиллярная уротелиальная опухоль с низким злокачественным потенциалом.

N o t e: PUNLMP – Papillary Urothelial Neoplasm with a low Malignancy Potential.

переменные, показавшие наибольшую статистическую значимость ($p < 0,1$) в моновариантном анализе. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Частота эпигенетических изменений гена *p16* в опухолях мочевого пузыря. Аномальное метилирование гена *p16* обнаружено в 18 из 158 уротелиальных карцином, что составило 11,4 %.

В ряде исследований сообщалось о высокой частоте аномального метилирования промоторной области гена *p16* при различных типах рака, в том числе при лимфоме, раке молочной железы, печени, толстой кишки [4–6]. При РМП, согласно данным разных авторов, частота эпигенетических изменений *p16* варьирует в пределах от 1 до 73 % [9]. Наиболее близкое к установленному нами значение частоты эпигенетических нарушений гена *p16*, равное 10,4 %, определено Friedrich и соавт. [10]. Обнаруженная нами сравнительно невысокая частота (11,4 %) аномального метилирования гена *p16* может быть обусловлена тем, что значительная доля уротелиальных карцином несет гомо- и гетерозиготные делеции этого локуса, захватывающие CpG-островки, в 10–30 и 40–60 % случаев соответственно [11].

Статистическая обработка данных показала отсутствие достоверной связи эпигенетических нарушений гена *p16* с демографическими и клинико-морфологическими параметрами (табл. 1), тем не менее обнаружены некоторые закономерности в их распределении в определенных подгруппах пациентов.

Гиперметилирование промоторной области гена *p16* наблюдалось несколько чаще при мышечно-инвазивном РМП (МИ РМП) (12,7 %) по сравнению с РМП без мышечной инвазии (РМП

БМИ) (10,7 %) ($p = 0,79$), причем наименьшая частота эпигенетических нарушений, равная 5,9 %, отмечалась в уротелиальных карциномах категории Та. Полученные нами данные находятся в соответствии с результатами мета-анализа, проведенного Qi и соавт. [12], в котором показана специфичность метилирования *p16* к опухолевой ткани мочевого пузыря, однако, вместе с тем, отсутствие его достоверной связи с особенностями клинического течения РМП.

При анализе подгруппы пациентов с мышечно-инвазивным раком установлена статистически значимая ассоциация эпигенетических нарушений *p16* с низкодифференцированными опухолями ($p = 0,039$): при категориях G1–2 метилирование обнаружено в 1 из 30 случаев (3,3 %), при G3 – в 6 из 25 случаев (24,0 %).

Выявлена тенденция ($p = 0,062$) к увеличению частоты аномального метилирования *p16* у курящих или куривших ранее пациентов (табл. 1). В случае анализа подгруппы пациентов исключительно с немышечно-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).

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 и соавт. [13] на большой выборке пациентов с РМП показана значимая связь метилирования *p16* с курением, что согласуется с нашими данными.

Анализ прогностического значения статуса метилирования гена p16. Поскольку изменение профиля метилирования обуславливает не только инициацию канцерогенеза, но и его прогрессию, нами проведена оценка роли эпигенетической изменчивости гена *p16* в предсказании отдаленных результатов лечения РМП.

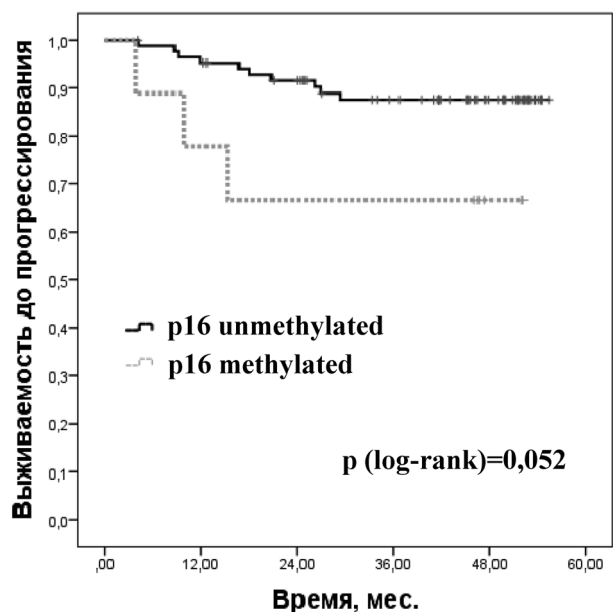
Анализ прогностического значения эпигенетических изменений проводился на выборке из 146 пациентов, отдаленные результаты лечения 12 пациентов не прослежены. Длительность наблюдения колебалась от 32 до 60 месяцев, медиана наблюдения составила 46 месяцев. В течение этого периода в группе из 94 пациентов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

Как видно из данных табл. 2, нами не выявлено прогностической значимости эпигенетических изменений гена *p16* в отношении рецидивирования и онкоспецифической выживаемости пациентов.

Т а б л и ц а 2. Анализ прогностического значения аномального метилирования гена *p16* в отношении отдаленных результатов лечения

Table 2. Analysis of the prognostic value of the *p16* gene abnormal methylation with respect to recurrence-free, progression-free, overall and cancer-specific survival

Отдаленный результат лечения Variable	Подгруппа Subgroup	Количество событий / общее число пациентов Number of events / total number of patients	3-летняя выживаемость (95 % ДИ) 3-year survival (95 % CI)	p (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)	
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)	
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)	
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)	
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)	
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)	



Выживаемость до прогрессирования в зависимости от статуса метилирования гена *p16*
Survival to progression depending on the *p16* gene methylation status

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 (рисунок).

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; $p = 0,015$).

Результаты большинства исследований указывают на отсутствие прогностической ценности эпигенетических изменений *p16* при РМП [10; 14]. Однако в ряде работ отмечалась статистически значимая ассоциация метилирования исследуемого гена с метастазированием, повышенным риском рецидивов и прогрессии заболевания [6; 15]. Нами выявлено 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.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о невысокой частоте (11,4 %) метилирования промоторной области гена *p16* в опухолевой ткани мочевого пузыря. При анализе общей группы пациентов обнаружено, что частота эпигенетических изменений *p16* не зависит от клинко-морфологических характеристик. В то же время в подгруппе пациентов с мышечно-инвазивным РМП аномальное метилирование *p16* статистически значимо связано с низкой степенью дифференцировки опухоли, а в подгруппе пациентов с немusечно-инвазивными уротелиальными карциномами – с курением, что указывает на возможное влияние канцерогенов табачного дыма на возникновение данных эпигенетических нарушений. Анализ прогностического значения аномального метилирования гена *p16* показал его независимое влияние на риск 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 перспективными мишенями для противораковой терапии. Особую актуальность восстановление профиля метилирования приобретает в связи с выявленной нами статистически значимой связью эпигенетических изменений гена *p16* с прогрессированием РМП БМИ. Использование данных о статусе метилирования гена *p16* в комплексе с другими молекулярными маркерами позволит своевременно выявлять группу пациентов высокого риска неблагоприятного исхода заболевания и применять адекватное лечение.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант M16K-017).

Acknowledgments. 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; под ред. О. Г. Суконко. – Минск: РНПЦ ОМР, 2014. – 382 с.
2. Enokida, H. Epigenetics in bladder cancer / H. Enokida, M. Nakagawa // *Int. J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 13, N 4. – P. 298–307. <https://doi.org/10.1007/s10147-008-0811-1>
3. 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.
4. Prognostic significance of epigenetic inactivation of p16, p15, MGMT and DAPK genes in follicular lymphoma / M. Krajnovic [et al.] // *Med. Oncol.* – 2013. – Vol. 30, N 1. – P. 441. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0441-3>
5. 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>
6. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors / G. Dominguez [et al.] // *Mutat. Res.* – 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)
7. Rocco, J. W. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression / J. W. Rocco, D. Sidransky // *Exp. Cell Res.* – 2001. – Vol. 264, N 1. – P. 42–55. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5149>
8. 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.
9. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events / R. R. Serizawa [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 129, N 1. – P. 78–87. <https://doi.org/10.1002/ijc.25651>
10. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma / M. G. Friedrich [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 41, N 17. – P. 2769–2778. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.07.019>
11. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma / Cancer Genome Atlas Research Network // *Nature.* – 2014. – Vol. 507, N 7492. – P. 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>
12. The relationship between promoter methylation of p16 gene and bladder cancer risk: a meta-analysis / D. Qi [et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2015. – Vol. 8, N 11. – P. 20701–20711.
13. 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>
14. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer / S. Jarmalaite [et al.] // *Oncology.* – 2008. – Vol. 75, N 3–4. – P. 145–151. <https://doi.org/10.1159/000158665>
15. 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>

References

1. Okeanov A. E., Moiseev P. I., Levin L. F. *Cancer Statistics in the Republic of Belarus (2004–2013)*. Minsk, Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology, 2014. 382 p. (in Russian).
2. 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>
3. 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.
4. Krajnovic 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>
5. 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, pp. e84453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084453>
6. 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)
7. Rocco J. W., Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Experimental Cell Research*, 2001, vol. 264, no. 1, pp. 42–55. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5149>
8. Zöchbauer-Müller S., Fong K. M., Virmani A. K., Gerads 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.
9. Serizawa R. R., Ralfkiaer U., Steven K., Lam G. W., Schmiedel S., Schütz 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>
10. 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>
11. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 2014, vol. 507, no. 7492, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>

12. 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.

13. 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/bgi172>

14. Jarmalaite S., Jankevicius F., Kurgonaitė K., Suziedelis K., Mutanen P., Husgafvel-Pursiainen K. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology*, 2008, vol. 75, no. 3–4, pp. 145–151. <https://doi.org/10.1159/000158665>

15. 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>

Информация об авторах

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

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

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

Набебина Татьяна Ивановна – канд. мед. наук, врач. РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, аг. Лесной, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: nabebina.t@yandex.by.

Красный Сергей Анатольевич – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заместитель директора. РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, аг. Лесной, Минский р-н, Минская обл., 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, Минск, Республика Беларусь). E-mail: R.Goncharova@igc.by.

Information about the authors

Smal Marharyta Petrovna – 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: marharyta.smal@gmail.com.

Nikitchenko Nataliya Vasilievna – 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.Nikitchenko@igc.by.

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

Nabebina Tatiana Ivanovna – Ph. D. (Medicine), Doctor. N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus (223040, Lesnoy, Minsk region, Minsk district, Republic of Belarus). E-mail: nabebina.t@yandex.by.

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

Goncharova Roza Iosifovna – D. Sc. (Biology), 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.