

Метилирование группы генов микроРНК: маркеры прогноза метастазирования почечно-клеточного рака

Н.В. Апанович¹, В.И. Логинов^{1, 2}, Е.А. Филиппова², Д.С. Ходырев³, А.М. Бурдённый², И.В. Пронина²,
Н.А. Иванова², С.С. Лукина², Т.П. Казубская⁴, В.Б. Матвеев⁴, А.В. Карпукхин¹, Э.А. Брага^{1, 2}

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
Федерального медико-биологического агентства России»; Россия, 115682 Москва, Ореховый бульвар, 28;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Александр Васильевич Карпукхин karpukhin@med-gen.ru

Введение. Почечно-клеточный рак (ПКР) не имеет симптомов вплоть до поздних стадий и характеризуется высокой частотой летальных исходов, достигающей 90 % при развитии метастатического процесса.

Цель исследования – определение группы генов микроРНК, метилирование которых ассоциировано с прогрессированием заболевания, в частности с метастазированием.

Материалы и методы. Методом метилспецифичной полимеразной цепной реакции на представительной выборке больных ПКР ($n = 98$) показано повышение статуса метилирования 6 генов микроРНК (MIR9-1, MIR9-3, MIR34b/c, MIR130b, MIR1258, MIR107) в образцах ДНК опухоли относительно парных образцов гистологически неизменной ткани.

Результаты. Для 4 генов (MIR9-1, MIR107, MIR130b, MIR1258) показана ассоциация метилирования с поздними (III–IV) стадиями, размером опухоли, потерей дифференцировки и метастазированием в лимфатические узлы или отдаленные органы. Из этих 4 генов методом ROC-анализа составлен набор маркеров прогноза метастазирования с клинической чувствительностью 68 % и специфичностью 84 % (площадь под ROC-кривой 0,83), который будет применен в окончательной разработке системы для персонализированной терапии больных ПКР.

Заключение. Ассоциация метилирования гена MIR1258 с метастазированием ПКР показана впервые и представляет самостоятельный интерес как новый перспективный маркер прогноза метастазирования.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, ген микроРНК, метилирование ДНК, прогрессирование рака, маркер метастазирования, MIR1258, ROC-анализ

Для цитирования: Апанович Н.В., Логинов В.И., Филиппова Е.А. и др. Метилирование группы генов микроРНК: маркеры прогноза метастазирования почечно-клеточного рака. Онкоурология 2020;16(4):32–8.

DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-4-32-38



Methylation of a group of microRNA genes: markers of renal cell carcinoma metastasis

N.V. Apanovich¹, V.I. Loginov^{1, 2}, E.A. Filippova², D.S. Khodyrev³, A.M. Burdenny², I.V. Pronina², N.A. Ivanova², S.S. Lukina²,
T.P. Kazubskaya⁴, V.B. Matveev⁴, A.V. Karpukhin¹, E.A. Braga^{1, 2}

¹N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

³Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies, Federal Medical Biological Agency of Russia; 28 Orekhovyy Boul'var, Moscow 115682, Russia;

⁴N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Renal cell carcinoma (RCC) is asymptomatic up to severe stages and is characterized by a high mortality rate, reaching 90 % with the development of a metastatic process.

Objective: to determine the group of microRNA genes, the methylation of which is associated with the progression of the disease, in particular, with metastasis.

Materials and methods. Methylation-specific polymerase chain reaction in a representative sample of RCC patients (98 cases) showed an increase in the methylation status of 6 microRNA genes (MIR9-1, MIR9-3, MIR34b/c, MIR130b, MIR1258, MIR107) in tumor DNA samples relative to matched samples of histologically unchanged tissue.

Results. For 4 genes (MIR9-1, MIR107, MIR130b, MIR1258), a significant association of methylation with late (III–IV) stages, tumor size, loss of differentiation, and metastasis to lymph nodes or distant organs was shown. These 4 genes were used to compose a potential metastatic prognosis marker system with a clinical sensitivity of 68 % and a specificity of 84 % (area under curve 0.83), which will be applied in the final development of a system for personalized therapy of RCC patients.

Conclusion. The association of methylation of the MIR1258 with RCC metastasis has been shown for the first time and is of independent interest as a new promising marker for the prognosis of metastatic relapses.

Key words: renal cell carcinoma, microRNA gene, DNA methylation, cancer progression, marker of metastasis, MIR1258, ROC curve

For citation: Apanovich N.V., Loginov V.I., Filippova E.A. et al. Methylation of a group of microRNA genes: markers of renal cell carcinoma metastasis. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2020;16(4):32–8. (In Russ.).

Введение

Злокачественные опухоли человека характеризуются обширными изменениями паттернов метилирования ДНК. Эти изменения включают глобальное гипометилирование генома опухолевых клеток и локальное гиперметилирование CpG-островков, многие из которых связаны с промоторами генов и регуляцией их экспрессии [1, 2]. Причем гипометилирование ДНК в опухолях участвует в возникновении нестабильности генома, а гиперметилирование промоторов служит инактивации супрессорных генов, вовлеченных в подавление процессов злокачественной трансформации и прогрессирования рака. К этим процессам относятся нарушение механизмов дифференцировки клеток, ускорение пролиферации, повышение устойчивости к апоптозу, стимулирование неоангиогенеза, увеличение подвижности клеток и ослабление межклеточных взаимодействий, развитие инвазии и метастазирования [3]. Гипо- и гиперметилирование генома опухолей включены в набор основных признаков рака, так называемых hallmarks of cancer [4]. При этом согласно гипотезе D. Hanahan и R.A. Weinberg прогрессирование заболевания и метастатическая активность опухолевых клеток определяются генами, в которых изменения накапливаются на последней стадии заболевания и коррелируют со степенью злокачественности опухоли [4]. Метилирование супрессорных и антиметастатических генов рассматривается как критический фактор развития и прогрессии опухоли, и гиперметилированные гены могут найти применение как диагностические и прогностические маркеры онкологического заболевания [5, 6].

МикроРНК (миРНК) – однонитевые некодирующие РНК длиной 19–25 нуклеотидов, участвуют в регуляции белоккодирующих генов на посттранскрипционном уровне. Гены миРНК, как и гены, кодирующие белки, подвержены метилированию [7]. При этом предполагается, что доля генов миРНК, регулируемых посредством метилирования CpG-островков, в несколько раз выше, чем структурных генов [8, 9], и гиперметилированные гены миРНК могут представлять новые эффективные биомаркеры рака.

Действительно, как показано нами и другими авторами, профили метилирования генов миРНК могут применяться как потенциальные биомаркеры для диагностики и прогноза течения разных видов рака [3, 10–14]. Так, при почечно-клеточном раке (ПКР) нами обнаружено до 10 гиперметилированных генов миРНК,

которые показали высокий диагностический потенциал [15–17].

Как известно, ПКР не имеет симптомов до поздних стадий и отличается очень высоким уровнем смертности среди урогенитальных видов рака [18, 19]. Наиболее распространенный светлоклеточный рак почки (90 %) характеризуется особенно агрессивным течением и частым метастазированием [20]. Диссемирующий ПКР крайне устойчив к терапии: ответ на химио-, радио- и иммунотерапию отмечается не более чем у 10 % больных [21, 22]. Показатели 5-летней выживаемости при наличии отдаленных метастазов снижаются до 9 % [21, 22]. Эти данные показывают необходимость поиска новых биомаркеров для своевременного предсказания метастатических рецидивов, что позволит скоординировать тактику лечения отдельных пациентов.

Цель исследования – с использованием представительной выборки образцов ($n = 98$) определить связь метилирования группы генов миРНК с показателями прогрессирования ПКР (стадия, степень дифференцировки, размер опухоли и наличие метастазов) и оценить прогностический потенциал гиперметилированных генов миРНК, ассоциированных с метастазированием.

Материалы и методы

Образцы опухолей ПКР собраны и клинически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Проанализированы парные образцы опухоли и гистологически неизменной ткани почки, полученные от 98 больных ПКР. Отбор образцов проводили, как описано ранее [15–17]. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани методом фенол-хлороформной экстракции [15]. Клинико-гистологические характеристики образцов по TNM-классификации [18] приведены в таблице.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан», получены информированные согласия больных.

Бисульфитную конверсию ДНК и метилспецифичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, как описано ранее [11–13]. Праймеры и условия метилспецифичной ПЦР для исследуемых фрагментов генов миРНК взяты из [11, 15–17]. Для каждого гена анализировали от 3 до 6 CpG-динуклеотидов. ПЦР

Клинические и гистологические характеристики 98 образцов почечно-клеточного рака
 Clinical and histological characteristics of 98 samples of renal cell carcinoma

Характеристика Characteristic	n
Гистологический тип: Histological type:	
онкоцитома oncocyoma	1
папиллярный почечно-клеточный рак 1-го типа type 1 papillary renal cell carcinoma	3
папиллярный почечно-клеточный рак 2-го типа type 2 papillary renal cell carcinoma	2
переходно-клеточный рак transitional cell carcinoma	2
светлоклеточный рак clear cell carcinoma	83
хромофобный рак chromophobe carcinoma	4
Клиническая стадия: Clinical stage:	
I	48
II	8
III	24
IV	15
Степень дифференцировки: Differentiation grade	
G ₁	12
G ₂	53
G ₃	28
G ₄	1
Размер опухоли: Tumor size:	
T1	49
T2	11
T3	33
T4	2
Метастазирование: Metastasis:	
N0/M0	73
N1–2/M1	22

проводили на амплификаторе T100 Thermal Cycler, (Bio-Rad, США) по программе: 1 цикл (95 °C, 5 мин); 35 циклов (95 °C, 10 с; T_{отж}, 20 с; 72 °C, 30 с); 1 цикл (72 °C, 3 мин). Ложноположительные результаты из-за неполной бисульфитной конверсии ДНК исключали на стадии подбора праймеров по отсутствию продукта метилспецифичной ПЦР на необработанной бисульфитом ДНК. Препарат метилированной ДНК человека (#SD1131, Thermo Scientific, США) использовали как контроль для метилированного аллеля, а препарат ДНК человека (#G1471, Promega, США) – как контроль для неметилированного аллеля. Продукты ПЦР от разных генов разделяли одновременно с использованием 2 % агарозного геля.

Статистический анализ проводили с применением точного критерия Фишера в программе AtteStat. Изменения считали значимыми при $p \leq 0,05$. Оптимальные системы маркеров выбирали по результатам ROC-анализа, проведенного с помощью ресурса <http://www.biosoft.hacettepe.edu.tr/easyROC/>

Результаты

Профиль гиперметилирования генов миРНК при светлоклеточном ПКР и их связь с прогрессированием заболевания. Результаты анализа метилирования 6 генов миРНК (*MIR9-1*, *MIR9-3*, *MIR34b/c*, *MIR130b*, *MIR1258*, *MIR107*) в 98 парных образцах ПКР, полученные с помощью метилспецифичной ПЦР, показаны на рис. 1. Повышенная частота метилирования в образцах опухолей в сравнении с гистологически неизменной тканью (условная норма) выявлена для всех 6 исследованных генов. При этом для всех 6 генов различия значимы ($p \leq 0,05$), а для 5 генов (кроме *MIR107*) – статистически высокозначимы ($p < 0,01$ с учетом поправки на множественные сравнения).

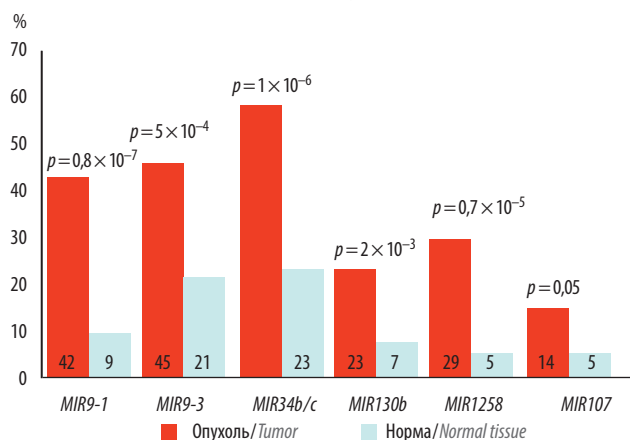


Рис. 1. Анализ метилирования 6 генов микроРНК на выборке из 98 образцов опухолей почечно-клеточного рака и 98 образцов парной гистологически неизменной ткани

Fig. 1. Analysis of DNA methylation in 6 microRNA genes in 98 samples of renal cell carcinoma and 98 paired samples of normal tissue

Данные по метилированию 6 генов в 98 образцах ПКР сопоставлены с клиничко-гистологическими характеристиками опухолей. Частота метилирования 4 генов (*MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*) оказалась значимо ($p < 0,05$) выше в образцах больных на поздних клинических стадиях, чем на I–II стадиях (рис. 2a). Однако с учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения ассоциация с III–IV клинической стадией статистически значима ($p < 0,01$) для 3 генов: *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258* (см. рис. 2a).

Определена значимая ассоциация ($p < 0,05$) метилирования 4 генов (*MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*) с увеличением размера опухоли (рис. 2б). С учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения с размером опухоли также статистически значимо

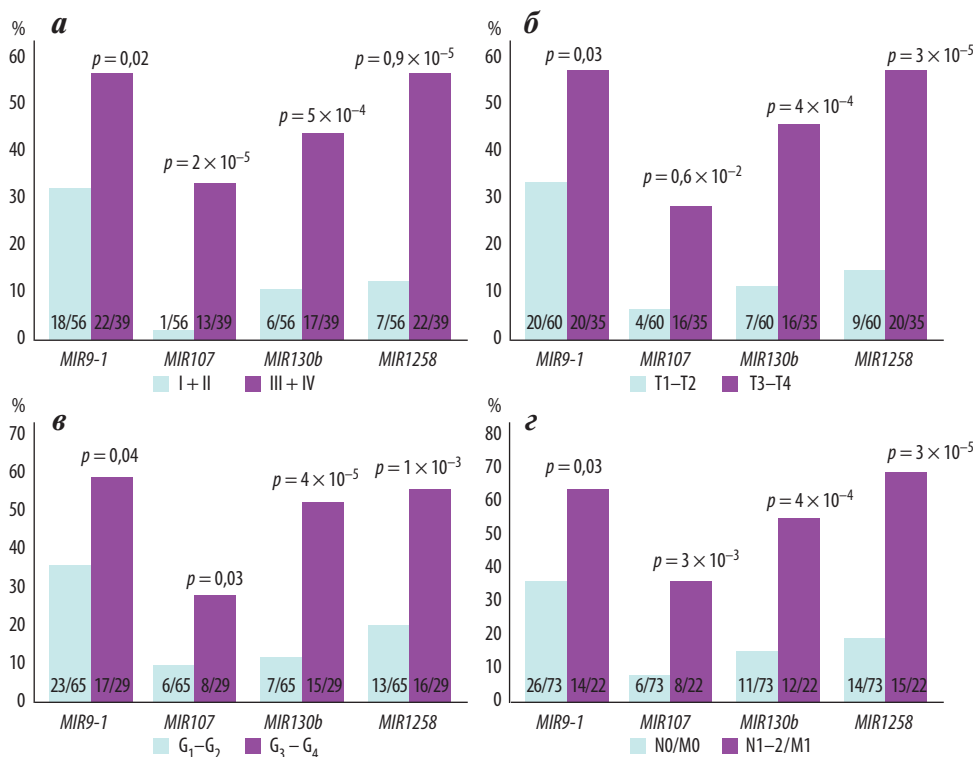


Рис. 2. Ассоциация метилирования генов микроРНК с клинико-гистологическими характеристиками прогрессирования почечно-клеточного рака: а – клинической стадией (I + II против III + IV); б – размером опухоли по классификации TNM (T1–T2 против T3–T4); в – степень дифференцировки опухоли (G₁–G₂ (высоко- и умеренно-дифференцированные) против G₃–G₄ (низкодифференцированные)); г – метастазированием (NOM0 против N1–2/M1)

Fig. 2. Association between DNA methylation in microRNA genes and clinical and histological characteristics of renal cell carcinoma progression: a – clinical stage (I + II vs III + IV); б – tumor size according to the TNM classification (T1–T2 vs T3–T4); в – differentiation grade (G₁–G₂ (highly and moderately differentiated) vs G₃–G₄ (poorly differentiated)); г – metastasis (NOM0 vs N1–2/M1)

связано ($p < 0,01$) метилирование тех же 3 генов: *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258* (см. рис. 2б).

Значимая связь ($p < 0,05$) метилирования со снижением степени дифференцировки опухолей показана для 4 генов (*MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*), но с учетом поправки Бенджамини–Хохберга на множественные сравнения связь с потерей дифференцировки статистически значима только для 2 генов: *MIR130b*, *MIR1258* (рис. 2в).

Проведено сравнение метилирования 6 генов (*MIR9-1*, *MIR9-3*, *MIR34b/c*, *MIR130b*, *MIR1258*, *MIR107*) в 73 образцах опухолей больных ПКР без метастазов и в 22 образцах опухолей больных ПКР с метастазами. Значимая связь ($p < 0,05$) с наличием метастазов выявлена для 4 генов: *MIR9-1*, *MIR130b*, *MIR1258*, *MIR107* (рис. 2г).

Потенциальные маркеры прогноза метастазирования ПКР. На основании полученных результатов о статусе метилирования 6 исследованных генов микроРНК в 73 образцах опухолей больных ПКР без метастазов и в 22 образцах опухолей больных с метастазами методом ROC-анализа составлена комбинация маркеров для выявления или прогнозирования метастазирования ПКР (рис. 3).

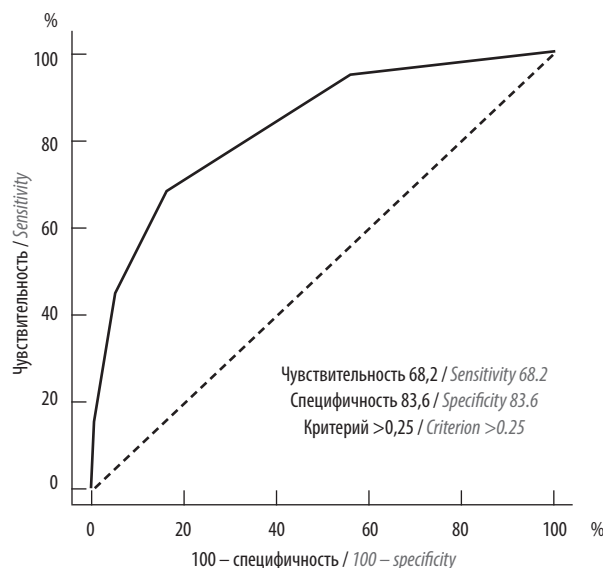


Рис. 3. Характеристики набора маркеров (*MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*) для прогнозирования метастазирования почечно-клеточного рака (площадь под ROC-кривой 0,83)

Fig. 3. Characteristics of markers (*MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*) for predicting metastasis of renal cell carcinoma (area under the ROC curve 0.83)

Обнаружение метилирования хотя бы 2 из этих 4 генов позволяет прогнозировать метастазирование ПКР с клинической чувствительностью 68 %, специфичностью 84 % и надежностью AUC (площадь под ROC-кривой) 0,83 (см. рис. 3).

В набор вошли все 4 гена, ассоциированные с метастазированием: *MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*, среди которых 3 гена – высокозначимо ($p < 0,01$), и ген *MIR9-1* менее значимо ($p < 0,05$). Удаление из набора наименее ассоциированного с метастазированием маркера *MIR9-1* приводило к повышению специфичности до 94 %, но к снижению чувствительности до 54,5 % и к некоторому уменьшению величины AUC до 0,79. Сочетание 3 маркеров, помимо сниженной чувствительности, будет обладать меньшей экспериментальной точностью из-за небольшого числа маркеров в панели. В связи с этим сочетание маркеров из 4 генов (*MIR9-1*, *MIR107*, *MIR130b*, *MIR1258*) представляется более оптимальным из исследованных генов миРНК.

Следует отметить, что связь метилирования гена *MIR1258* с ПКР ($p = 7 \times 10^{-6}$) и метастазированием ($p = 3 \times 10^{-5}$) обнаружена при этом виде рака впервые. При этом степень ассоциации с метастазированием метилирования гена *MIR1258* ($p = 3 \times 10^{-5}$) является наиболее высокозначимой среди других исследованных маркеров миРНК на данной выборке образцов. Таким образом, маркер *MIR1258* представляет самостоятельный интерес и может быть применен для прогноза метастазирования в комбинации с другими новыми маркерами метилирования или экспрессии.

Обсуждение

В данной работе изучено изменение статуса метилирования 6 генов миРНК (*MIR9-1*, *MIR9-3*, *MIR34b/c*, *MIR130b*, *MIR1258*, *MIR107*) на представительной выборке парных образцов опухолей и гистологически неизмененных тканей почки от 98 больных ПКР. Следует отметить, что ранее было изучено метилирование до 10 генов миРНК на меньшей выборке (50–70) образцов ПКР [15–17], что позволило составить наборы маркеров для диагностики ПКР.

Метилирование гена *MIR1258* при светлоклеточном ПКР в данной работе исследовано впервые. Ранее для миРНК, кодируемой этим геном, показаны свойства супрессора и ингибирующее влияние на развитие и прогрессирование многих видов рака, например колоректального рака и рака молочной железы [23, 24]. Однако метилирование гена *MIR1258* ранее выявлено только при раке легкого и множественной

миеломе [11, 25]. При этом показано, что метилирование *MIR1258* функционально, так как оно ассоциировано со снижением уровня miR-1258 [25]. Интересно, что одной из прямых мишеней этой миРНК является лиганд программируемой клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1), который играет роль контрольной точки иммунитета [25]. Ранее о метилировании гена *MIR1258* при ПКР и его супрессорной и антиметастатической роли в ПКР не сообщалось.

Проблема поиска маркеров метастазирования достаточно значима, так как фактически они являются прогнозом метастатических рецидивов. В литературе имеются сообщения о маркерах диагностики и прогноза метастазирования ПКР на основе анализа экспрессии генов, в том числе выполненные авторами настоящей работы [26–29], а также на основе экспрессии миРНК, например miR-429, или миРНК семейства miR-200 [30, 31]. Набор из 3 миРНК (miR-21, -142-3p, -194) позволил прогнозировать метастазирование ПКР с чувствительностью 86,7 % и специфичностью 82,0 % [32]. Однако анализ ДНК не требует дорогих реактивов и, по-видимому, окажется более пригодным для клинической практики. В литературе мы не нашли наборов маркеров прогноза метастазирования ПКР по ДНК-метилированию генов миРНК.

Заключение

Нами на основе анализа метилирования 4 генов миРНК на представительной выборке образцов ПКР ($n = 98$) впервые разработан набор маркеров, выявляющих или прогнозирующих метастазирование ПКР с клинической чувствительностью 68 %, специфичностью 84 % и надежностью AUC 0,83, который может найти применение в персонализированном лечении пациентов. При этом нами идентифицирован новый ген *MIR1258*, метилирование которого высокоассоциировано с метастазированием ПКР, и который может иметь самостоятельное значение для подбора наиболее эффективной комбинации маркеров с новыми генами на основе анализа их метилирования или экспрессии. В то же время наиболее эффективным подходом может оказаться сочетание маркеров на основе метилирования генов миРНК и экспрессии белоккодирующих генов. Такой подход уже был реализован нами ранее при разработке системы диагностики светлоклеточного рака почки, что позволило повысить характеристики системы до приемлемых с точки зрения практического применения значений [33]. Указанный подход планируется применить и в разработке клинически значимой системы прогноза метастазирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Eden A., Gaudet F., Waghmare A., Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003;300(5618):455. DOI: 10.1126/science.1083557.
- Deaton A.M., Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2011;25(10):1010–22. DOI: 10.1101/gad.2037511.
- Baylin S.B., Jones P.A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8(9):019505. DOI: 10.1101/cshperspect.a019505.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Pfeifer G.P. Defining driver DNA methylation changes in human cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1166. DOI: 10.3390/ijms19041166.
- Locke W.J., Guanzone D., Ma C. et al. DNA Methylation cancer biomarkers: translation to the clinic. *Front Genet* 2019;10:1150. DOI: 10.3389/fgene.2019.01150.
- Vrba L., Muñoz-Rodríguez J.L., Stampfer M.R., Futscher B.W. MiRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One* 2013;8(1):54398. DOI: 10.1371/journal.pone.0054398.
- Kunej T., Godnic I., Ferdin J. et al. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mut Res* 2011;717(1–2):77–84. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008.
- Piletić K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch Toxicol* 2016;90(10):2405–19. DOI: 10.1007/s00204-016-1815-7.
- Moutinho C., Esteller M. MicroRNAs and epigenetics. *Adv Cancer Res* 2017;135:189–220. DOI: 10.1016/bs.acr.2017.06.003.
- Рыков С.В., Ходырев Д.С., Пронина И.В. и др. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. *Генетика* 2013;49(7):896–901. [Rykov S.V., Khodyrev D.S., Pronina I.V. et al. Novel miRNA genes methylated in lung tumors. *Genetika = Genetics* 2013;49(7):896–901. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S1022795413070119.
- Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В. и др. Идентификация новых генов микроРНК, гиперметилированных при раке молочной железы. *Молекулярная биология* 2016;50(5):797–802. [Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V. et al. Novel miRNA genes hypermethylated in breast cancer. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2016;50(5):797–802. (In Russ.)]. DOI: 10.7868/S0026898416050104.
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M. et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene* 2017;604:1–8. DOI: 10.1016/j.gene.2016.12.018.
- Логинов В.И., Рыков С.В., Фридман М.В., Брага Э.А. Метилирование генов микроРНК и онкогенез. *Биохимия* 2015;80(2):184–203. [Loginov V.I., Rykov S.V., Fridman M.V., Braga E.A. Methylation of miRNA genes and oncogenesis. *Biohimiya = Biochemistry* 2015;80(2):184–203. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S0006297915020029.
- Береснева Е.В., Рыков С.В., Ходырев Д.С. и др. Профиль метилирования группы генов микроРНК при светлоклеточном почечно-клеточном раке; связь с прогрессией рака. *Генетика* 2013;49(3):366–75. [Beresneva E.V., Rykov S.V., Khodyrev D.S. et al. Methylation profile of group of miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma; involvement in cancer progression. *Genetika = Genetics* 2013;49(3):366–75. (In Russ.)]. DOI: 10.1134/S1022795413030034.
- Береснева Е.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др. Гиперметилированные гены микроРНК как потенциальные маркеры светлоклеточного рака почки. *Клиническая лабораторная диагностика* 2017;62(1):13–8. [Beresneva E.V., Loginov V.I., Khodyrev D.S. et al. The hypermethylated genes microRNA as potential markers of clear-cell carcinoma of kidney. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics* 2017;62(1):13–8. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-1-13-18.
- Логинов В.И., Береснева Е.В., Казубская Т.П. и др. Метилирование 10 генов микроРНК при светлоклеточном раке почки и их диагностическое значение. *Онкоурология* 2017;13(3):27–33. [Loginov V.I., Beresneva E.V., Kazubskaya T.P. et al. Methylation of 10 miRNA genes in clear cell renal cell carcinoma and their diagnostic value. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(3):27–33. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-3-27-33.
- Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark* 2011;9(1–6):461–73. DOI: 10.3233/CBM-2011-0176.
- Vasudev N.S., Selby P.J., Banks R.E. Renal cancer biomarkers: the promise of personalized care. *BMC Med* 2012;10:112. DOI: 10.1186/1741-7015-10-112.
- Rydzanicz M., Wrzesinski T., Bluysen H.A., Wesoly J. Genomics and epigenomics of clear cell renal cell carcinoma: recent developments and potential applications. *Cancer Lett* 2013;341(2):111–26. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.08.006.
- Randall J.M., Millard F., Kurzrock R. Molecular aberrations, targeted therapy, and renal cell carcinoma: current state-of-the-art. *Cancer Metastasis Rev* 2014;33(4):1109–24. DOI: 10.1007/s10555-014-9533-1.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2016. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2015. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2016. 236 p. (In Russ.)].
- Hwang J.S., Jeong E.J., Choi J. et al. MicroRNA-1258 inhibits the proliferation and migration of human colorectal cancer cells through suppressing CKS1B expression. *Genes* 2019;10(11):912. DOI: 10.3390/genes10110912.
- Zhao X. MiR-1258 regulates cell proliferation and cell cycle to inhibit the progression of breast cancer by targeting E2F1. *Biomed Res Int* 2020;2020:e1480819. DOI: 10.1155/2020/1480819.
- Wang L.Q., Kumar S., Calin G.A. et al. Frequent methylation of the tumour suppressor miR-1258 targeting PDL1: implication in multiple myeloma-specific cytotoxicity and prognostification. *Br J Haematol* 2020;190(2):249–61. DOI: 10.1111/bjh.16517.
- Apanovich N.V., Peters M.V., Apanovich P.V. et al. The Genes – candidates for prognostic markers of metastasis by expression level in clear cell renal cell cancer. *Diagnostics* 2020;10(1):30. DOI: 10.3390/diagnostics10010030.
- Apanovich N.V., Peters M.V., Apanovich P.V. et al. Association of target therapy gene expression with metastasizing of clear-cell renal cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2018;166(2):257–9. DOI: 10.1007/s10517-018-4327-z.
- Apanovich N.V., Peters M.V., Apanovich P.V. et al. Expression profiles of genes – potential therapy targets – and their relationship to survival in renal cell carcinoma. *Dokl Biochem Biophys* 2018;478(1):14–7. DOI: 10.1134/S1607672918010040.
- Apanovich N.V., Peters M.V., Korotaeva A.A. et al. Molecular genetic diagnostics of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Urol* 2016;12(4):16–20. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-4-16-20.
- Machackova T., Mlcochova H., Stanik M. et al. MiR-429 is linked to metastasis

- and poor prognosis in renal cell carcinoma by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Tumour Biol* 2016;37(11):14653–8. DOI: 10.1007/s13277-016-5310-9.
31. Saleeb R., Kim S.S., Ding Q. et al. The miR-200 family as prognostic markers in clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2019;37(12):955–63. DOI: 10.1016/j.urolonc.2019.08.008.
32. Lokeshwar S.D., Talukder A., Yates T.J. et al. Molecular characterization of renal cell carcinoma: a potential three-microRNA prognostic signature. *Cancer Epid Biomark Prev* 2018;27(4):464–72. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0700.
33. Апанович Н.В., Логинов В.И., Апанович П.В. и др. Совместное определение экспрессии и метилирования генов для диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака. *Онкоурология* 2018;14(4):16–21. [Apanovich N.V., Loginov V.I., Apanovich P.V. et al. A joint determination of gene expression and methylation for the diagnosis of clear cell renal cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(4): 16–21. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-4-16-21.

Вклад авторов

Н.В. Апанович: анализ данных, оформление статьи;
 В.И. Логинов: получение данных для анализа, разработка и написание методики;
 Е.А. Филиппова, Д.С. Ходырев: статистические расчеты, оценка прогностической значимости маркеров;
 А.М. Бурдённый, Н.А. Иванова, С.С. Лукина: анализ метилирования отдельных генов;
 И.В. Пронина: обзор публикаций по теме статьи;
 Т.П. Казубская: получение клинико-гистологических характеристик образцов;
 В.Б. Матвеев: выяснение клинических характеристик больных;
 А.В. Карпукhin: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 Э.А. Брага: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи.

Authors' contributions

N.V. Apanovich: data analysis, article formatting;
 V.I. Loginov: obtaining data for analysis, development and writing of a methodology;
 E.A. Filippova, D.S. Khodyrev: statistical calculations, assessment of the prognostic significance of markers;
 A.M. Burdenny, N.A. Ivanova, S.S. Lukina: analysis of methylation of individual genes;
 I.V. Pronina: reviewing of publications of the article's theme;
 T.P. Kazubskaya: obtaining clinical and histological characteristics of samples;
 V.B. Matveev: clarification of the clinical characteristics of patients;
 A.V. Karpukhin: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, article editing;
 E.A. Braga: developing the research design, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.В. Апанович / N.V. Apanovich: <https://orcid.org/0000-0002-9221-115X>
 В.И. Логинов / V.I. Loginov: <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>
 Е.А. Филиппова / E.A. Filippova: <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>
 А.М. Бурдённый / A.M. Burdenny: <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>
 И.В. Пронина / I.V. Pronina: <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>
 Т.П. Казубская / T.P. Kazubskaya: <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>
 В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
 А.В. Карпукhin / A.V. Karpukhin: <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>
 Э.А. Брага / E.A. Braga: <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках Государственного задания Минобрнауки России на 2020 г.
Financing. The study was carried out within the framework of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of Russia for 2020.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», № 2017-4/2.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical Ethics Committee of the N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics (the approval number 2017-4/2).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 12.10.2020. **Принята к публикации:** 09.11.2020.
Article submitted: 12.10.2020. **Accepted for publication:** 09.11.2020.