

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 127 – 137

**ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF METHYLATION GENES *P16*
AND *SEPT9* WITH THE RISK OF COLORECTAL CANCER**

A. V. Perfilyeva¹, S. E. Abdikerim¹, K. B. Djantayeva¹, O. A. Ixan¹, O. B. Muchambetov¹,
S. A. Kasimuratova¹, E. B. Kuzovleva¹, K. S. Utegenova¹, G. S. Zhunussova¹,
E. M. Khussainova¹, G. A. Afonin², B. O. Bekmanov¹, L. B. Djansugurova¹

¹«Institute of General Genetics and Cytology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,

²Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

E-mail: nastyaper2009@mail.ru

Keywords: colorectal cancer, DNA methylation, epigenetics.

Abstract. Conducted molecular genetic analysis of cell cycle regulating and cell proliferation – *p16*, *SEPT9* gene promoters in health patient and during development of colorectal cancer. Identified the potential practical test for methylation of the promoter region of the *p16* gene in intestinal tissue and *SEPT9* gene in intestinal tissue and in peripheral blood for the diagnosis of colorectal cancer.

УДК 577.2:616-006

**АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ *P16* И *SEPT9*
С РИСКОМ РАЗВИТИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

А. В. Перфильева¹, С. Е. Абдикерим¹, К. Б. Джантаева¹, О. А. Иксан¹, О. Б. Мухамбетов¹,
С. А. Касимуратова¹, Е. Б. Кузовлева¹, К. С. Утегенова¹, Г. С. Жунусова¹, Э. М. Хусайнова¹,
Г. А. Афонин², Б. О. Бекманов¹, Л. Б. Джансугурова¹

¹«Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²Казахский Национальный Медицинский Университет им. С. Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: колоректальный рак, метилирование ДНК, эпигенетика.

Аннотация. Проведен молекулярно-генетический анализ метилирования промоторов генов регуляции клеточного цикла и пролиферации клеток *p16*, *SEPT9* в норме и при развитии колоректального рака. Выявлен практический потенциал теста на метилирование промоторной области гена *p16* в ткани кишечника и гена *SEPT9* в ткани кишечника и периферической крови для диагностики колоректального рака.

В последнее десятилетие в большинстве цивилизованных стран мира отмечается неуклонное увеличение показателей заболеваемости населения колоректальным раком (КРР). Согласно данным Международного агентства по изучению рака КРР является третьей по частоте злокачественной опухолью у мужчин (после бронхолегочного рака и рака простаты) и второй – у женщин (после рака молочных желез) [1]. Ежегодная заболеваемость достигает 1 миллиона случаев, а ежегодная смертность превышает 500 000 человек. По прогнозам экспертов в последующие два десятилетия количество больных КРР будет возрастать за счет увеличения количества населения планеты и роста доли в нем пожилых людей.

В Республике Казахстан КРР занимает 4-ое место в структуре заболеваемости среди всех онкопатологий и 3 место в структуре смертности. 5-летняя выживаемость составляет менее 47%.

Это связано с тем, что большинство пациентов поступают в онкологические, хирургические, колопроктологические стационары с запущенными стадиями заболевания, нередко на фоне развившихся осложнений, таких как кишечная непроходимость, параканцероматозные инфильтраты, абсцесс, кровотечение. Все это существенно ухудшает непосредственные и отдаленные результаты лечения больных [2].

Важнейшим условием успешного лечения КРР является обнаружение опухолевого процесса на ранних стадиях. Это свидетельствует о необходимости изыскания способов раннего выявления рака и предраковых заболеваний толстого и прямого кишечника. Одним из путей является проведение скрининга. Конечной целью онкологического скрининга принято считать снижение смертности больных, а непосредственным результатом – обнаружение рака до момента клинического проявления.

Согласно рекомендациям Американского онкологического сообщества в Республике Казахстан в 2011 г введен скрининг на раннее выявление предопухолевых и опухолевых заболеваний толстой и прямой кишки, и тест на определение «скрытой» крови в стуле является первым этапом программы скрининга КРР. Однако помимо трудностей в методологии проведения теста сообщается также об его ограниченной чувствительности. При выявлении положительного результата на «скрытую» кровь врачом поликлиники пациент направляется на колоноскопию при наличии показаний. Однако колоноскопия – не всегда идеальный метод диагностики, особенно плоских аденом [3]. Кроме того она требует длительных временных затрат, тщательной подготовки, крайне некомфортной для пациента, что является частой причиной отказа от прохождения рекомендуемых профилактических осмотров.

В последние годы все чаще предпринимаются попытки использовать молекулярно-генетические методики для выявления пациентов с высоким риском развития КРР. Диагностическое и прогностическое значение может иметь эпигенетическое метилирование ключевых генов коло-ректального канцерогенеза.

Метилирование происходит путем ферментативного присоединения метильной группы к цитозину в составе ДНК. В ДНК млекопитающих, большая часть 5'-метилцитозинов сосредоточена в 5'-CpG-3' динуклеотидах. Гиперметилирование CpG-островков приводит к стабильной инактивации прилежащего гена, то есть феномену MAGI (*methylation-associated gene inactivation*). Это происходит в результате возникновения препятствий к связыванию транскрипционных факторов или гетерохроматинизации, опосредованной метилцитозин-связывающими белками MBD [4]. Если прилежащим геном окажется ген домашнего хозяйства, то его инактивация будет летальна для клетки, но не будет иметь особых последствий для организма. Подавление экспрессии какого-либо из тканеспецифических генов нанесет определенный ущерб дифференциальному фенотипу клетки, не оказывая влияния на общую жизнеспособность. В то же время, инактивация гена опухолевой супрессии может создать условия для неконтролируемой пролиферации и развития рака.

Целью настоящего исследования было изучение ассоциации статуса метилирования генов *p16* и *SEPT9*, участвующих в регуляции клеточного цикла и пролиферации клеток, с риском развития КРР.

Материалы и методы исследования

На базе ГКП на ПХВ «Алматинский онкологический центр» и КГКП «Региональный онкологический диспансер г. Семей» собран клинический материал для исследования, представляющий больных колоректальным раком из г. Алматы и г. Семей. Всего собрано: образцы опухолевой ткани 37 больных КРР, из них у троих пациентов одновременно с биопсией опухолевой ткани были взяты образцы периферической непораженной ткани кишечника, у 13 пациентов – периферическая кровь.

После забора проводили подробное анкетирование, а также оформляли добровольное информированное согласие. Анкеты были разработаны в лаборатории молекулярной генетики Института общей генетики и цитологии. Разработку формы добровольного информированного согласия, информационного листка для пациента, протокола исследования и другие необходимых документов проводили под руководством члена авторского коллектива Б. К. Хайдарова совместно с

сотрудниками кафедры онкологии, маммологии и лучевой терапии КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова. Этическая комиссия в 2012 г. при РГП на пхв «Казахский национальный медицинский университет им. С. Д. Асфендиярова» дала одобрение на проведение исследования. Все анкетные данные и истории болезней были обработаны и внесены в электронную базу данных.

Подбор контрольной группы проводился на базе данных (анкетные данные и данные клинических обследований) лаборатории молекулярной генетики. Клинический материал от этих людей был собран в 2008–2014 гг. в ходе выполнения проектов проведенных в Институте общей генетики и цитологии КН МОН РК (Алматы, Казахстан). Замороженные образцы крови и ДНК (–20 – –80°C) хранятся в биобанке. Всего для контрольной группы были отобраны образцы периферической крови 37 условно здоровых лиц.

Выделение ДНК. ДНК из образцов периферической крови и ткани выделялись использованием набора для быстрого выделения ДНК «*Genomic DNA Purification Kit*» (*Thermo Fisher Scientific*, США) и методом фенол-хлороформной экстракции. Количество и качество выделенной ДНК оценивали при помощи спектрофотометра и электрофореза в 0,7% агарозном геле. Образцы ДНК хранили при –20 и –80°C.

Метил-чувствительная полимеразная цепная реакция. Для определения метилирования промоторной области генов был использован метод метил-чувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Метод основан на способности метил-чувствительной рестриктазы *Hin6I* (*Thermo Fisher Scientific*, США) расщеплять 5'-GCGC-3' последовательности ДНК, не подвергшиеся метилированию, и оставлять негидролизованными 5'-GCGC-3' участки, содержащие метилцитозин. В случае метилирования промоторной области гидролиз ДНК не происходит, и продукт ПЦР может быть выявлен в агарозном геле. При отсутствии метилирования происходит полный гидролиз ДНК, и продукт ПЦР не выявляется в агарозном геле.

Метод включает в себя два этапа:

– гидролиз геномной ДНК. ДНК в количестве 150 нг расщепляли 40 U метил-чувствительной рестриктазы *Hin6I* в реакционном буфере при 37 °C в течение 12 ч.

– полимеразная цепная реакция. 50 нг гидролизованной и 50 нг негидролизованной ДНК были амплифицированы в 20 µl ПЦР смеси, включающей 10 µl 2× *PCR MasterMix* (0.05 U/µL *TaqDNA polymerase*, *reaction buffer*, 4 mM $MgCl_2$, 0.4m M of each dNTP (*Thermo Fisher Scientific*, США)) и 5 пМоль каждого праймера.

Негидролизованная ДНК была включена в эксперимент в качестве контроля для подтверждения того, что отсутствие продукта амплификации гидролизованной ДНК является результатом рестрикционного расщепления ДНК, а не ошибочной постановки ПЦР или низкого качества ДНК-матрицы. Для дизайна соответствующих праймеров были исследованы промоторные последовательности изучаемых генов в базе данных геномов *NCBIGeneBank* и *SwitchGearGenomics*. Генерация праймеров и проверка их комплементарности соответствующим генам проведена по алгоритму *PrimerBLASTGenBank* (таблица 1). Для сгенерированных праймеров был проведен анализ возможного образования вторичных структур с помощью программы *OligoAnalyzer 3.1*. Праймеры подбирались так, чтобы амплифицируемый фрагмент содержалне менее 1 и не более 9 сайтов узнавания для рестриктазы *Hin6I*.

Таблица 1 – Последовательность праймеров для МЧ-ПЦР

Название праймера	Последовательность (5' → 3')	Размер ПЦР-продукта bp
<i>p16</i>	ССТССТGATTGGCGGATAGA	216
	СССТАGCTACATCCGTCACC	
<i>SEPT9</i>	TTGCATCCTCTCACCCTGC	185
	GCAGAGTGCGTCGATTGAGT	

Амплификацию проводили в 20 мкл в приборе «*Master cycler nexus gradient*» (*Eppendorf*, Германия) с использованием *PCR MasterMix* (*Thermo Fisher Scientific*, США) при следующих температурных условиях: 1 мин. денатурации при 95°C, за которой следовали 35 циклов амплификации в режиме 95°C – 1 мин., 60°C – 1 мин., 72°C – 1 мин. и реакция была завершена при

температуре 72°C в течение 5 мин. с последующим охлаждением до температуры 4°C. Визуализацию амплификатов проводили в 1,4% агарозном геле.

Методы статистической обработки результатов. Достоверность различий (P) между группами определяли с использованием Chi^2 и *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считался результат, для которого уровень значимости *p* не превышал 0,05 (5% ошибки). Для расчета характеристик диагностического теста использовали калькулятор веб-сайта кафедры теоретической биохимии с курсом клинической биохимии *Волгоградского государственного медицинского университета (Волгоград, Россия)*. Данный калькулятор позволяет рассчитать чувствительность, специфичность диагностического теста и его предсказательную (прогностическую) ценность с использованием «латинского квадрата».

Результаты и их обсуждение

Характеристика контрольной группы и групп больных КРР. Всего в группе больных КРР было 37 человек. Подбор контрольной группы проводился на основе анализа базы данных (анкетные данные и данные клинических обследований) лаборатории молекулярной генетики. Клинический материал от этих людей был собран в 2008–2014 гг. в ходе выполнения проектов проведенных в Институте общей генетики и цитологии КН МОН РК. Замороженные образцы крови и ДНК (–20 - –80°C) хранятся в биобанке.

Всего для контрольной группы были отобраны образцы периферической крови 37 условно здоровых лиц. Контрольная популяция условно здоровых доноров подбиралась в максимально возможном соответствии с анкетными данными больных КРР людей по критериям национальности, возраста, пола и наличию или отсутствию вредных привычек (употребление табачной и алкогольной продукции). Также, контрольная группа не имела биологически родственных связей с пациентами и семейной истории злокачественных новообразований.

Социально-демографическая характеристика групп и данные по соответствию популяций больных КРР и здоровых людей представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Соответствие контрольной группы и группы больных

Характеристика		КРР N, %	Контроль N, %	t_{st}	<i>p</i>
Всего		37	37		
Национальность	Казахская	17 (46)	17 (46)	0,031	0,980
	Русская	15 (41)	16 (43)	0,219	0,862
	Др. азиаты	5 (13)	4 (11)	0,344	0,789
Возраст, лет	Средний	60,08 ± 11,50	59,24±11,77	0,0510	0,968
	Интервал	31-80	31-79		
Пол	Мужской	17 (46)	17 (46)	0	1,000
	Женский	20 (54)	20 (54)	0	1,000
Употребление табачных изделий	Да (ранее или по сей день)	13 (35)	10 (27)	0,610	0,651
	Нет	24 (65)	27 (73)	0,418	0,748
Употребление алкогольной продукции	Да	4 (11)	6 (16)	0,598	0,657
	Нет	33 (89)	31 (84)	0,250	0,844

Национальный состав обеих групп не имел статистически значимых различий: 46% казахов, 41% русских и 13% др. азиат в группе КРР; 46% казахов, 43% русских и 11% др. азиат в группе контроль. Среди других азиатских национальностей в группе КРР были 1 представитель корейской национальности, 2 – татарской, 2 – уйгурской; в контрольной группе – 1 представитель корейской национальности, 1 – татарской, 2 – уйгурской. Средний возраст в обеих группах также не имел статистически значимых различий: 60,08 ± 11,50 – в группе КРР и 59,24±11,77 в группе контроль. Соотношение полов в группах было идентичным: 46% мужчин и 54% женщин.

В отношении наличия или отсутствия вредных привычек когорты делились на две подгруппы: в одну из них входили употребляющие табачные или алкогольные изделия в настоящее время или употреблявшие ранее, в другую входили никогда не курившие и не употреблявшие алкогольную продукцию. Сравнительная характеристика по этим критериям группы больных КРР с группой контроль не имела статистически значимой разницы.

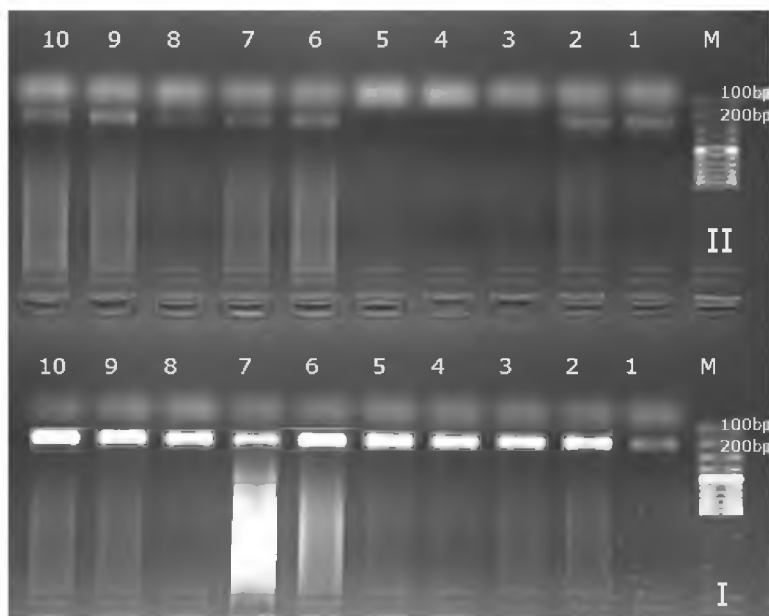
Среди больных КРР 16 (43%) пациентов имели рак толстой кишки, 21 (57%) – прямой кишки. Распределение пациентов с КРР по стадиям было следующим: I–II стадии – 26 (70%) человек, III–IV стадии – 11 (30%) человек.

Из клинического материала контрольной группы и группы КРР была выделена ДНК и далее использовалась для молекулярно-генетического анализа метилирования генов опухолевой супрессии.

Анализ метилирования гена *p16*. В локусе 9p21 клонировано и картировано два гена: ген *p16/INK4A/CDKN2A/MTS1* и ген *p19/ARF*. Белок – супрессор опухолевого роста p16 играет ключевую роль в контроле клеточного цикла. На молекулярном уровне действие белка p16 основано на ингибировании регуляторов клеточного цикла. Белок p16 – ингибитор циклин-зависимых киназ и является участником биохимического пути *Rb/cyclinD/cdk4/p16INK4a*. Утрата этого белка или его инактивация ведут к тому, что клетка теряет контроль над клеточным циклом. Экспериментально показано, что снижение экспрессии p16 приводит к гиперфосфорилированию pRB. В таком состоянии этот белок не может оставаться связанным с фактором транскрипции E2F. Поэтому комплекс RB-E2F диссоциирует и свободный фактор E2F активирует транскрипцию генов, специфичных для S фазы (*S-phase-specific-gene*). Происходит вхождение клетки в S фазу клеточного цикла.

Ген *p16* может быть инактивирован путем метилирования его промоторной области, без наличия каких-либо точковых мутаций в его последовательности [5]. Подобные изменения гена могут происходить в процессе канцерогенеза, поэтому метилирование *p16* изучается в качестве маркера различных онкологических заболеваний.

В данной работе был исследован статус метилирования промотора гена *p16* при развитии колоректального рака методом метил-чувствительной ПЦР со специфичными праймерами (рисунок 1).



I – продукты контрольной амплификации негидролизованного участка промоторной области гена *p16* (фрагмент в области 216 bp).

II – продукты амплификации гидролизованного метилчувствительной рестриктазой *HinfI* участка промоторной области гена *p16*, положительный сигнал (фрагмент в области 216 bp) указывает на метилирование (образцы 1,2,6-10).

Рисунок 1 – Анализ метилирования промоторной области гена *p16* в образцах опухолевой ткани кишечника, электрофорез в 1,4% геле

В результате анализа статуса метилирования гена *p16* получены следующие результаты: в 16 образцов опухолевой ткани кишечника из 37 обследованных было выявлено метилирование промоторной области данного гена, что составило 43% (таблица 3).

Таблица 3 – Диагностические характеристики теста на метилирование промоторной последовательности гена *p16* для выявления КРР

Группа:	<i>p16</i> метил в ткани		<i>p16</i> метил в крови	
	да	нет	да	нет
КРР, чел.	16 (43%)	21 (57%)	1 (8%)	12(92%)
Контроль, чел.			1 (3%)	36(97%)
$t_{ст}$	0,963	1,793	0.714	0.156
p	0,326	0,181	0.398	0.693
Диагностическая чувствительность	43,24%		7,96%	
Диагностическая специфичность	97,29%		97,29%	
Прогностическая ценность положительного результата	94,11%		50%	
Прогностическая ценность отрицательного результата	36,84%		25%	
Диагностическая эффективность теста	70,27%		74%	

Кроме того, у 3 пациентов с II, III и IV стадиями, помимо метилирования в малигнизированном эпителии, аналогичное эпигенетическое изменение имело место в гистологически нормальной, прилежащей к опухоли ткани. Данный факт позволяет предположить, что метилирование данного гена является ранним молекулярным маркером злокачественной трансформации КРР, определяемым уже на II стадии. Однако стоит учитывать, что наличие метилирования в прилежащей к опухоли ткани может быть связано и с контаминацией исследуемого материала опухолевыми клетками.

В 13 обследованных образцах периферической крови пациентов с КРР метилирование было обнаружено только в одном случае (8%), при этом у этого пациента имело место метилирование также в опухолевой, и непораженной периферической ткани кишечника. Стоит отметить, что у данного пациента диагностировался рак прямой кишки IV стадии с метастазами в печень и субкомпенсированной толстокишечной непроходимостью. По-видимому, подобная картина выявления метилирования как в образцах ткани, так и в образцах крови пациента обусловлена широким распространением *опухолевых клеток* с током крови при метастазировании.

Анализ корреляции метилирования промоторной области гена *p16* с локализацией опухоли позволил установить, что метилирование этого гена больше ассоциируется с опухолями прямой кишки (10/16), чем с опухолями ободочной кишки (6/16). Возможно, этот факт связан с тем, что в выборке пациентов с КРР была большая доля больных раком прямой кишки.

В ДНК крови 37 здоровых доноров метилирование промоторного района гена было определено в 1 случае (3%).

Анализ диагностических характеристик теста на метилирование промоторной последовательности гена *p16* в ткани кишечника для выявления КРР дал следующие результаты: чувствительность – 43,24%, специфичность – 97,29%, прогностическая ценность положительного результата – 94,11% и отрицательного результата – 36,84%, диагностическая эффективность теста – 70,27%. Диагностические характеристики теста на метилирование промоторной последовательности гена *p16* в крови для выявления КРР следующие: чувствительность – 7,96%, специфичность – 97,29%, прогностическая ценность положительного результата – 50% и отрицательного результата – 25%, диагностическая эффективность теста – 74% (таблица 3). Невысокие показатели чувствительности в данном случае могут объясняться небольшим числом исследованных образцов крови в группе КРР.

Литературные данные о связи метилирования гена *p16* с развитием КРР достаточно многочисленны. В исследовании Goto [6] статус метилирования *p16* был изучен в 50 образцах опухо-

левой ткани первичного КРР и соответствующих 50 контрольных образцах нормальной ткани методом количественной ПЦР (qMSP). Абберантное метилирование было обнаружено в 20 случаях из 50 (40%), представляющих КРР. Достоверная ассоциация была выявлена с более поздними стадиями по Duke ($p = 0.0495$) и инвазией в регионарные лимфатические узлы ($p = 0.0277$).

Было проведено ряд работ по определению метилирования промотора *p16* в сыворотке крови больных КРР. В работе *Esteller* [7] метилирование обнаружено в 42 из 113 (37%) случаев первичного колоректального рака, кроме того этот показатель был ассоциирован с плохим прогнозом выживаемости пациента. В работе *Nakayama* [8] частота метилирования *p16* в сыворотке крови больных с первичным КРР составила 47%. В позднем исследовании этого же автора [9] аномальное метилирование промотора гена *p16* обнаружено в 24 из 34 (71%) образцов сыворотки ДНК, взятых у больных с рецидивом КРР. Сравнение этих данных с предыдущим исследованием позволило автору сделать вывод о возможном использовании данного маркера для оценки вероятности рецидива после хирургического удаления опухоли кишечника. В работе *Zou* [10] гиперметилирование промотора *p16* было выявлено в опухолевой ткани у 20 из 52 (38%) больных КРР. Среди этих 20 пациентов наличие метилирования этого же гена в сыворотке крови определялось у 14 (70%). Не было выявлено данного эпигенетического изменения в сыворотке крови у представителей контрольной группы, включающей 34 пациента с аденоматозным полипозом и 10 здоровых волонтеров. Более того, было показано, что метилирование *p16* в сыворотке ассоциировалось с более поздними стадиями заболевания.

В 2013 г. был опубликован мета-анализ 11 исследований 3440 пациентов [11]. Показана достоверная корреляция между неблагоприятным прогнозом общей выживаемости и наличием в геноме гиперметилирования гена *p16* (HR = 1,65, 95% CI 1,29–2,11). Более того, была выявлена ассоциация этого биомаркера с лимфоваскулярной инвазией (OR = 1,68, 95% CI 1,15–2,47), метастазами в регионарные лимфоузлы (OR = 1,68, 95% CI 1,09–2,59) и проксимальной локализацией опухоли (OR = 2,09, 95% CI 1,34–3,26) при развитии КРР.

Таким образом, результаты нашей работы совпадают с результатами других опубликованных исследований о наличии ассоциации метилирования гена *p16* с развитием колоректального рака.

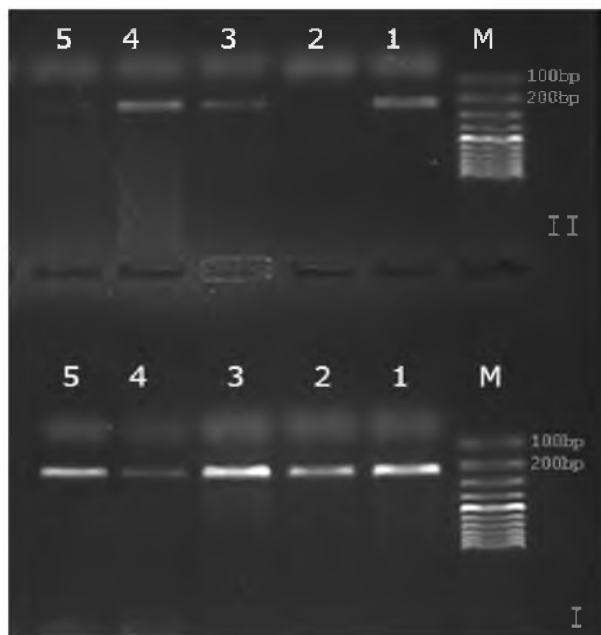
Анализ метилирования гена *SEPT9*. Ген септина 9 (известного также как септиноподобный слитый белок MLL, септиноподобный слитый белок MLLMSF-A, *Slpa*, эсептин, *Msf*, септиноподобный белок яичников/септин молочной железы (септинOv/Br) и септин D1) находится на хромосоме 17q25 и является членом семейства генов септина. Семейство септинов у человека включает 13 генов (*Sept1-13*), каждый из которых в результате альтернативного сплайсинга «рождает» несколько вариантов тканеспецифичных септинов [12]. *SEPT9* имеет по меньшей мере семь транскриптов, которые кодируют пять изоформ белка (*SEPT9_v1-SEPT9_v5*) [13].

Септины состоят из полиосновного (из остатков основных аминокислот) и ГТФ-связывающего доменов. Биологическая функция септинов связана с их способностью собираться в полимеры (в виде колец, спиралей пучков и сеток), которые могут формировать каркасы (для прикрепления определенных белков) и барьеры для диффузии везикул и крупных молекул [14]. Таким образом в клетках млекопитающих септины участвуют в создании клеточной полярности, компарментализации (создании обособленных «отсеков» в цитоплазме, в пределах которых ограничено передвижение везикулярных структур и макромолекул), везикулярном транспорте, регуляции актинового и тубулинового цитоскелета, процессах экзо- и эндонитоза [15]. Септины формируют уникальные сети, характеризующиеся мультифункциональностью, внутренним непостоянством и динамичной чувствительностью.

Повреждение экспрессии септинов у человека сопровождается онкологическими и другими заболеваниями [16]. Одним из механизмов нарушения экспрессии гена является метилирование его промоторной последовательности.

В данной работе был исследован статус метилирования промотора гена *SEPT9* при развитии колоректального рака. Для определения метилирования был использован метод МЧ-ПЦР со специфичными праймерами (рисунок 2).

В результате анализа были получены следующие результаты: для 20 образцов опухолевой ткани кишечника из 37 обследованных было показано метилирование промоторной области гена *SEPT9*, что составило 54% (таблица 4).



I полоса – продукты контрольной амплификации негидролизованного участка промоторной области гена *SEPT9* (фрагмент в области 185 bp).

II полоса – продукты амплификации гидролизованного участка промоторной области гена *SEPT9*, положительный сигнал (фрагмент в области 185 bp) указывает на метилирование промоторной области данного гена (образцы 1, 3, 4, 5).

Рисунок 2 – Анализ метилирования промоторной области гена *SEPT9* в образцах опухолевой ткани кишечника, электрофорез в 1,4% геле

Таблица 4 – Диагностические характеристики теста на метилирование промоторной последовательности гена *SEPT9* для выявления КРР

Группа	<i>SEPT9</i> метил в ткани кишечника		<i>SEPT9</i> метил в крови	
	да	нет	да	нет
КРР, чел.	20 (54%)	17 (46%)	8(62%)	5 (38%)
Контроль, чел.			12(32%)	25(68%)
t_{st}	1.289	1.170	1.448	0.948
p	0.256	0.279	0.229	0.330
Диагностическая чувствительность	54.05%		61,53%	
Диагностическая специфичность	67.56%		67,56%	
Прогностическая ценность положительного результата	62.5%		40%	
Прогностическая ценность отрицательного результата	40.47%		16,66%	
Диагностическая эффективность теста	60.81%		66%	

Кроме того, у 2 пациентов с III и IV стадиями, помимо метилирования промотора септина 9 в малигнизированном эпителии, аналогичное эпигенетическое изменение имело место в гистологической нормальной, прилежащей к опухоли ткани. Данный факт позволяет предположить, что метилирование данного гена является ранним молекулярным маркером злокачественной трансформации КРР. Однако стоит учитывать, что наличие метилирования в прилежащей к опухоли ткани может быть связано и с контаминацией исследуемого материала опухолевыми клетками.

Из 13 обследованных образцов периферической крови пациентов с КРР метилирование было обнаружено в 8 случаях (62%). Интересно, что у двух пациентов метилирование промотора гена септина 9 было обнаружено в крови, но не было показано в опухолевой ткани их кишечника.

Возможная причина того, что метилирование гена обнаруживается в крови, но отсутствует в опухолевой ткани, может заключаться в гетерогенности опухоли. Вследствие этой гетерогенности, при отборе материала в биопсийный образец могли попасть опухолевые клетки, в которых не происходило метилирование.

Данным обстоятельством может быть объяснен и тот факт, что у одного пациента было обнаружено метилирование в периферической непораженной ткани кишечника, однако не идентифицировалось в опухолевой ткани.

Анализ корреляции метилирования промоторной области гена *SEPT9* с локализацией опухоли позволил установить, что метилирование этого гена в большей мере ассоциируется с опухолями прямой кишки (11/20), чем с опухолями ободочной кишки (9/20). Возможно, этот факт связан с тем, что в выборке пациентов с КРР была большая доля больных раком прямой кишки.

В ДНК крови 37 представителей контрольной группы метилирование промоторного района гена *SEPT9* было определено у 12 человек (32%).

Анализ диагностических характеристик теста на метилирование промоторной последовательности гена *SEPT9* в ткани кишечника для выявления КРР дал следующие результаты: чувствительность – 54,05%, специфичность – 67,56%, прогностическая ценность положительного результата – 62,5% и отрицательного результата – 40,47%, диагностическая эффективность теста – 60,81%. Аналогичные характеристики при проведении теста на метилирование *SEPT9* в периферической крови следующие: чувствительность – 61,53%, специфичность – 67,56%, прогностическая ценность положительного результата – 40% и отрицательного результата – 16,66%, диагностическая эффективность теста – 66% (таблица 4). Определение метилированной ДНК в гене *SEPT9* в качестве нового диагностического метода для скрининга КРР было изучено во многих зарубежных исследованиях.

При определении метилирования данного гена в периферической крови чувствительность данного метода в работе *Grützmann et al.* [17] без учета стадии заболевания составила 90%, специфичность – 88%. При целенаправленном изучении метода на ранней стадии болезни чувствительность определения метилированной ДНК в гене *SEPT9* достигала 87% независимо от локализации опухоли [18].

В 2010 на *Digestive Disease Week (DDW)* были представлены результаты проспективного исследования 7 941 пациентов в возрасте 50 - 75 лет без симптомов КРР из 32 клиник США и Германии, которые прошли рутинное колоноскопическое исследование [19]. Кровь для исследования метилирования *SEPT9* была отобрана у каждого пациента, полученные результаты сравнивались с результатами колоноскопии. *SEPT9* тест был положительным в 67% случаев КРР и дал ложноположительный результат в 11%. Исследование убедительно показало, что указанный метод может быть эффективно использован у лиц, не имеющих специфических симптомов болезни.

В другой работе российских авторов [20] диагностическая чувствительность теста при определении метилированного гена *SEPT9* в крови составила 87,1%, специфичность – 96%, диагностическая эффективность – 90,6%, что превышало эффективность иммуногистохимического метода анализа кала на скрытую кровь (41,9%). Определение в крови метилированной ДНК гена *SEPT9* было эффективно при ранних стадиях рака толстой кишки, а также при проксимальной и дистальной локализациях опухоли, что позволило сделать вывод о возможности использования данного теста при затруднениях в проведении колоноскопии.

Таким образом, наши результаты согласуются с опубликованными данными других исследований об обнаружении метилирования гена *SEPT9* в клиническом материале пациентов с колоректальным раком.

В данной работе проведен молекулярно-генетический анализ статуса метилирования генов регуляции клеточного цикла и пролиферации клеток *p16* и *SEPT9* в норме и при патологии КРР. Результаты анализа свидетельствуют о практическом потенциале теста на метилирование промоторной области гена *p16* в ткани кишечника и гена *SEPT9* в ткани кишечника и периферической крови для диагностики КРР.

Предполагается дальнейший сбор клинического материала и увеличение объема как контрольной группы, так и группы больных с КРР для продолжения молекулярно-генетического исследования эпигенетических нарушений при развитии КРР.

Источник финансирования исследований. Работа была выполнена в рамках Гранта 3771/ГФ4 по теме: «Разработка системы эпигенетических маркеров для диагностики sporadических форм колоректального рака», финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан» на 2015–2017 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // International Journal of Cancer. – 2010. – Vol. 127, N 12. – P. 2893-2917.
- [2] Турбекова М.Н., Егеубаева С.А. Современные подходы к раннему выявлению колоректального рака (литературный обзор) // Вестник КазНМУ. Онкология. – 2012. – № 1. – С. 137-141.
- [3] Da Silva J.G., De Brito T., Cintra Damiao A.O. et al. Histologic study of colonic mucosa in patients with chronic diarrhea and normal colonoscopic findings // J Clinical Gastroenterology. – 2006. – Vol. 40(1). – P. 44-48.
- [4] Robertson K.D., Jones P.A. DNA methylation: past, present and future directions // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21(3). – P. 461-467.
- [5] Merlo A., Herman J.G., Mao L. et al. 5 CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers // Nature Med. – 1995. – Vol. 1. – P. 686-692.
- [6] Goto T., Mizukami H., Shirahata A. et al. Aberrant methylation of the *p16* gene is frequently detected in advanced colorectal cancer // Anticancer Res. – 2009. – Vol. 29(1). – P. 275-277.
- [7] Esteller M., Gonzalez S., Risques R.A. et al. *K-ras* and *p16* aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer // J Clin Oncol. – 2001. – Vol. 19. – P. 299-304.
- [8] Nakayama H., Hibi K., Taguchi M. et al. Molecular detection of *p16* promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients // CancerLett. – 2002. – Vol. 188. – P. 115-119.
- [9] Nakayama H., Hibi K., Takase T. et al. Molecular detection of *p16* promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients // IntJ Cancer. – 2003. – Vol. 105. – P. 491-493.
- [10] Zou H.Z., Yu B.M., Wang Z.W. et al. Detection of aberrant *p16* methylation in the serum of colorectal cancer patients // Clin Cancer Res. – 2002. – Vol. 8. – P. 188-191.
- [11] Xing X., Cai W., Shi H. et al. The prognostic value of *CDKN2A* hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis // Br J Cancer. – 2013. – Vol. 108(12). – P. 2542-2548.
- [12] Hall P.A., Todd C.B., Hyland P.L. et al. The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors // Clin Cancer Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 6780-6786.
- [13] Scott M., Hyland P.L., McGregor G. et al. Multimodality expression profiling shows *SEPT9* to be overexpressed in a wide range of human tumours // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – P. 4688-4700.
- [14] Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins // Nature. – 2007. – Vol. 449. – P. 311-315.
- [15] Hall P., Russell S.E. The pathobiology of the septin gene family // J Pathol. – 2004. – Vol. 204. – P. 489-505.
- [16] Grützmann R., Molnar B., Pilarsky C. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by *Septin9* DNA methylation assay // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3. – P. 1-8.
- [17] Weiss G., Fassbender A., Koenig T., Tetzner R. Sensitivity of second-generation blood-based methylated *Septin9* assay for early-stage colorectal cancer // J Clin Oncol. – 2012. – Vol. 30. – S4. – A419.
- [18] Church T.R., Wandell M., Lofton-Day C. et al. Prospective clinical validation of an assay for methylated *SEPT9* DNA in human plasma as a colorectal cancer screening tool in average risk men and women 50 years and older // Digestive Disease Week. – 2010. – P. 1-5. – LB-711d.
- [19] Бурцев Д.В., Кит О.И., Максимов А.Ю. Эффективность и оптимизация эпигенетических методов при молекулярном скрининге рака толстой кишки // Практическая медицина. – 2012. – № 61. – С. 90-94.

REFERENCES

- [1] Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // International Journal of Cancer. 2010. Vol. 127, N 12. P. 2893-2917.
- [2] Turbekova M.N., Egeubaeva S.A. Sovremennye podkhody k rannemu vyivleniiu kolorektalnogo raka (literaturnyi obzor) // Vestnik KazNMU. Onkologiya. 2012. N 1. P. 137-141.
- [3] Da Silva J.G., De Brito T., Cintra Damiao A.O. et al. Histologic study of colonic mucosa in patients with chronic diarrhea and normal colonoscopic findings // J Clinical Gastroenterology. 2006. Vol. 40(1). P. 44-48.
- [4] Robertson K.D., Jones P.A. DNA methylation: past, present and future directions // Carcinogenesis. 2000. Vol. 21(3). P. 461-467.
- [5] Merlo A., Herman J.G., Mao L. et al. 5 CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers // Nature Med. 1995. Vol. 1. P. 686-692.
- [6] Goto T., Mizukami H., Shirahata A. et al. Aberrant methylation of the *p16* gene is frequently detected in advanced colorectal cancer // Anticancer Res. 2009. Vol. 29(1). P. 275-277.
- [7] Esteller M., Gonzalez S., Risques R.A. et al. *K-ras* and *p16* aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer // J Clin Oncol. 2001. Vol. 19. P. 299-304.
- [8] Nakayama H., Hibi K., Taguchi M. et al. Molecular detection of *p16* promoter methylation in the serum of colorectal cancer patients // CancerLett. 2002. Vol. 188. P. 115-119.

- [9] Nakayama H., Hibi K., Takase T. et al. Molecular detection of *p16* promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients // *Int J Cancer*. 2003. Vol. 105. P. 491-493.
- [10] Zou H.Z., Yu B.M., Wang Z.W. et al. Detection of aberrant *p16* methylation in the serum of colorectal cancer patients // *Clin Cancer Res*. 2002. Vol. 8. P. 188-191.
- [11] Xing X., Cai W., Shi H. et al. The prognostic value of *CDKN2A* hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis // *Br J Cancer*. 2013. Vol. 108(12). P. 2542-2548.
- [12] Hall P.A., Todd C.B., Hyland P.L. et al. The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors // *Clin Cancer Res*. 2005. Vol. 11. P. 6780-6786.
- [13] Scott M., Hyland P.L., McGregor G. et al. Multimodality expression profiling shows *SEPT9* to be overexpressed in a wide range of human tumours // *Oncogene*. 2005. Vol. 24. P. 4688-4700.
- [14] Sirajuddin M., Farkasovsky M., Hauer F. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins // *Nature*. 2007. Vol. 449. P. 311-315.
- [15] Hall P., Russell S.E. The pathobiology of the septin gene family // *J Pathol*. 2004. Vol. 204. P. 489-505.
- [16] Grützmann R., Molnar B., Pilarsky C. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by *Septin9* DNA methylation assay // *PLoS ONE*. 2008. Vol. 3. P. 1-8.
- [17] Weiss G., Fassbender A., Koenig T., Tetzner R. Sensitivity of second-generation blood-based methylated *Septin9* assay for early-stage colorectal cancer // *J Clin Oncol*. 2012. Vol. 30. S4. A419.
- [18] Church T.R., Wandell M., Lofton-Day C. et al. Prospective clinical validation of an assay for methylated *SEPT9* DNA in human plasma as a colorectal cancer screening tool in average risk men and women 50 years and older // *Digestive Disease Week*. 2010. P. 1-5. LB-711d.
- [19] Burtsev D.V., Kit O.I., Maksimov A.Iu. Effektivnost' i optimizatsiia epigeneticheskikh metodov pri molekuliarnom skrininge raka tolstoi kishki // *Prakticheskaja meditsina*. 2012. N 61. P. 90-94.

КОЛОРЕКТАЛЬДЫ ІСІКТІҢ ДАМУЫНА *P16* ЖӘНЕ *SEPT9* ГЕНДЕРІ МЕТИЛЬДЕНУІНІҢ ӘСЕРІН ТАЛДАУ

А. В. Перфильева¹, С. Е. Әбдікерім¹, К. Б. Жантаева¹, О. А. Иксан¹, О. Б. Мұхамбетов¹,
С. А. Касимуратова¹, Е. Б. Кузовлева¹, Қ. С. Утегенова¹, Г. С. Жүнісова¹, Э. М. Хусаинова¹,
Г. А. Афонин², Б. О. Бекманов¹, Л. Б. Жансүгірова¹

¹ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты», Алматы, Қазақстан,
²С. Д. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: колоректальды ісік, ДНҚ метильдену, эпигенетика.

Аннотация. Қалыпты жағдайда және колоректальды ісіктің дамуы кезінде клетка циклінің реттелуі мен клетка пролиферациясына жауапты *p16* және *SEPT9* гендеріндегі промоторлық бөліктерінің метильденуіне молекулалы-генетикалық талдау жүргізілді. Колоректальды ісікті диагностикалау үшін алынған ішек ұлпасындағы *p16* генінің және ішек ұлпасы мен перифериялық қаннан алынған *SEPT9* генінің промоторлық бөліктеріндегі метильденуге жүргізілген тестілеудің практикалық потенциалы анықталды.

Постуила 04.05.2016 г.