

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 2, Number 320 (2017), 160 – 167

A. V. Perflyeva<sup>1</sup>, S. E. Abdikerim<sup>1</sup>, S. A. Kasimuratova<sup>1</sup>, L. A. Skvortsova<sup>1</sup>,  
G. S. Zhunussova<sup>1</sup>, E. M. Khussainova<sup>1</sup>, G. A. Afonin<sup>2,3</sup>, B. O. Bekmanov<sup>1</sup>, L. B. Djansugurova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«Institute of General Genetics and Cytology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,

<sup>2</sup>Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan,

<sup>3</sup>Almaty Cancer Center, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: nastyaper2009@mail.ru

**ANALYSIS OF THE ASSOCIATION  
OF METHYLATION GENES *APC*, *MLH1* AND *RASSF1A*  
WITH THE RISK OF COLORECTAL CANCER**

**Abstract.** There was conducted molecular genetic analysis of DNA repair, cell cycle regulation and apoptosis - *MLH1*, *APC* and *RASSF1A* gene promoters in patient and during development of colorectal cancer. There was identified the potential practical test for methylation of the promoter region of *APC* and *RASSF1A* genes in intestinal tissue and *MLH1* gene in intestinal tissue and in peripheral blood for the diagnosis of colorectal cancer.

**Keywords:** colorectal cancer, DNA methylation, epigenetics.

УДК 577.2:616-006

А. В. Перфильева<sup>1</sup>, С. Е. Абдикерим<sup>1</sup>, С. А. Касимуратова<sup>1</sup>, Л. А. Скворцова<sup>1</sup>,  
Г. С. Жунусова<sup>1</sup>, Э. М. Хусаинова<sup>1</sup>, Г. А. Афонин<sup>2,3</sup>, Б. О. Бекманов<sup>1</sup>, Л. Б. Джансугурова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

<sup>2</sup>Казахский национальный медицинский университет им. С. Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан,

<sup>3</sup>Алматинский онкологический центр, Алматы, Казахстан

**АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРОВ  
ГЕНОВ *APC*, *MLH1* И *RASSF1A*  
С РИСКОМ РАЗВИТИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

**Аннотация.** Проведен молекулярно-генетический анализ метилирования промоторов генов репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза *MLH1*, *APC* и *RASSF1A* в норме и при развитии колоректального рака. Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности тестов на метилирование генов *APC* и *RASSF1A* в ткани кишечника, гена *MLH1* – в ткани кишечника и периферической крови для диагностики КРР.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, метилирование ДНК, эпигенетика.

По последним статистическим данным в Казахстане колоректальный рак (КРР) занимает лидирующие позиции по онкозаболеваемости (9,0 на 100 тыс. населения), уступая лишь раку молочной железы (12,1), раку кожи (10,9), раку легких (10,7) [1]. В большинстве случаев развитие КРР носит спорадический характер. Показатели смертности от данного заболевания также очень высоки: 70 умерших на каждые 100 новых больных КРР. Основные перспективы в снижении таких высоких показателей заболеваемости и смертности связаны с созданием и совершенствованием методов диагностики, обладающих научно-обоснованной эффективностью. С 2011 года в РК

внедрена государственная скрининговая программа по раннему выявлению КРР, основой которой является регулярное проведение гемокульт-теста (определение «скрытой» крови в кале), сигмо- и колоноскопии. Однако в связи с выявляемыми недостатками данных методов диагностики возникает необходимость поиска дополнительных маркеров, которые позволят оптимизировать выполнение национальных скрининговых программ.

Диагностическое и прогностическое значение может иметь эпигенетическое метилирование ключевых генов колоректального канцерогенеза. Целью настоящего исследования было изучение ассоциации статуса метилирования генов репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза *MLH1*, *APC* и *RASSF1A* с риском развития КРР.

### Материалы и методы исследования

Сбор клинического материала осуществлялся на базе ГКП на ПХВ «Алматинский онкологический центр».

Материалом для исследования служили образцы периферической крови условно здоровых лиц; образцы периферической крови, опухолевой и периферической непораженной ткани больных колоректальным раком. Диагноз устанавливали опытные специалисты вышеуказанных медицинских учреждений на основе клинических обследований.

Кровь из локтевой вены для обследования в количестве 5 мл собирали в условиях стационара и поликлиники с использованием системы для забора крови в вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА. Забор образцов опухолевой и периферической непораженной ткани больных колоректальным раком осуществлялся во время операций. Из операционного материала врачами вырезались фрагменты тканей не более 1 см и помещались в пробирки типа эппендорф на лед. После забора проводили подробное анкетирование, а также оформляли добровольное информированное согласие. Этическая комиссия в 2016 г. при РГП на пхв «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова» дала одобрение на проведение исследования.

**Выделение ДНК.** ДНК из образцов периферической крови и свежемороженой ткани выделяли с использованием набора для быстрого выделения ДНК «ДНК-СОРБ-В» (производство АмплиСенс, ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, Россия), а также методом фенол-хлороформной экстракции. Количество и качество выделенной ДНК оценивали при помощи спектрофотометра и электрофореза в 0,7% агарозном геле. Образцы ДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Метил-чувствительная полимеразная цепная реакция.** Для определения метилирования промоторной области генов *MLH1* был использован метод метил-чувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР). Для гидролиза 150 нг ДНК расщепляли 40 U метил-чувствительной рестриктазы *Hin6I* (*ThermoFisherScientific*, США) в реакционном буфере при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 12 ч. 50 нг гидролизованной и 50 нг негидролизованной ДНК были амплифицированы в 20  $\mu\text{L}$  ПЦР смеси, включающей 10  $\mu\text{L}$  2  $\times$  *PCR MasterMix* (0.05 U/ $\mu\text{L}$  *TaqDNA polymerase*, *reaction buffer*, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4m M of each dNTP (*ThermoFisherScientific*, США)) и 5 пМоль каждого праймера (таблица 1).

Визуализацию амплификатов проводили в 1,4% агарозном геле.

Таблица 1 – Последовательность праймеров

| Название праймера | Последовательность<br>(5'→3') | Размер<br>ПЦР-продукта bp | Температура<br>отжига, °C |
|-------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| MLH1[2]           | CGCTCGTAGTATTCGTGC            | 608 bp                    | 55                        |
|                   | ACCTCAGTGCCTCGTGCTCACGTTC     |                           |                           |
| RASSF1A [3]       | GGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGACGAA    | 150 bp                    | 64                        |
|                   | GGGCGGCGGGAAGGAGCTGAGGAGA     |                           |                           |
| 1AM1 [4]          | TGTTTTGCGGATTTTTTC            | 158 bp                    | 60                        |
|                   | GCAATAAAACACAAAACCCCG         |                           |                           |
| 1AU [4]           | GTGTTTATTGTGGAGTGTGGGTT       | 110 bp                    |                           |
|                   | CCAATCAACAAACTCCCAACAA        |                           |                           |

**Метил-специфичная ПЦР.** Оценка статуса метилирования промотора гена *APC* проводилась методом метил-специфичной ПЦР с двумя парами праймеров. Для бисульфитной модификации ДНК использовали набор реагентов *EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific, США)* в соответствии с приложенным протоколом. 40-80 нг модифицированной ДНК были амплифицированы в 20 µl ПЦР смеси, включающей 10 µl  $2 \times \text{PCR MasterMix}$  (0.05 U/µl *Taq DNA polymerase*, *reaction buffer*, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4mM of each dNTP (*ThermoScientific, США*)) и 5 пМоль каждого праймера 1AM1 и 1AU (таблица 1). Визуализацию амплификатов проводили в 2% агарозном геле.

**Методы статистической обработки результатов.** Достоверность различий (P) между группами определяли с использованием *Chi2* и *t*-критерия Стьюдента. Различия между группами считались статистически не значимы при  $p > 0,05$ . Данное исследование проводилось по типу «случай-контроль», поэтому при статистическом анализе применялся показатель отношения шансов. Для расчета OR и CI 95% использовали онлайн-калькулятор Медицинская статистика [5] и Биометрика [6].

### Результаты и их обсуждение

**Характеристика контрольной группы и групп больных КРР.** Всего в группе больных КРР было 50 человек, у которых была отобрана биопсия опухолевой ткани кишечника, при этом у 21 (42%) пациента был диагностирован рак толстой кишки, у 29 (58%) - рак прямой кишки; I стадия (T1N0M0; T2N0M0) была определена у 4 пациентов (8%), II стадия (T3N0M0; T4N0M0) - 26 (52%), III (любая T N1M0; любая T N2M0; любая T N3M0) - 16 (32%), IV стадия (любая T любая NM1) - 4 (8%). У 16 пациентов парно, одновременно с биопсией опухолевой ткани, были взяты образцы периферической непораженной гистологически нормальной ткани кишечника и у 26 пациентов - периферическая кровь.

В качестве контроля для 50 образцов опухолевой ткани от пациентов с КРР были взяты 16 образцов гистологически нормальной ткани, полученных от тех же пациентов с КРР. Для 26 образцов периферической крови от больных КРР, которые в соответствии с методом случай-контроль должны были быть проанализированы в сравнении с образцами периферической крови от здоровых людей, была подобрана контрольная группа. Подбор контрольной группы условно-здоровых людей 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 генетики и цитологии. Всего для контрольной группы были отобраны образцы периферической крови 30 условно здоровых лиц.

Социально-демографическая характеристика обеих групп не имела статистически значимых различий (таблица 2).

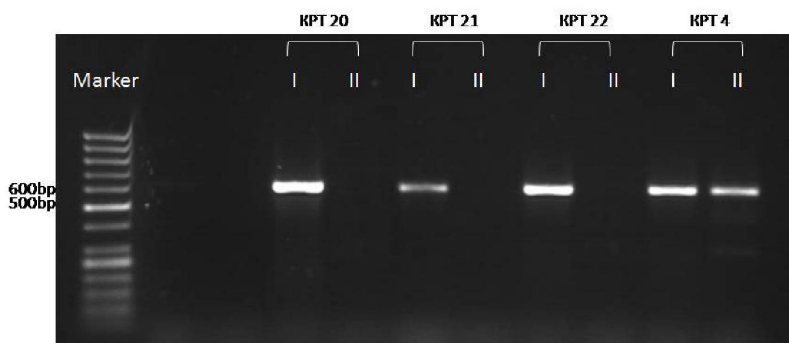
Таблица 2 – Соответствие контрольной группы и группы больных

| Характеристика                     |                            | КРР N (%)   | Контроль N (%) | $t_{st}$ | p     |
|------------------------------------|----------------------------|-------------|----------------|----------|-------|
| Всего                              |                            | 26          | 30             |          |       |
| Национальность                     | Казахская                  | 8(31)       | 11(37)         | 0,372    | 0,773 |
|                                    | Русская                    | 12(46)      | 15(50)         | 0,206    | 0,871 |
|                                    | Др. азиаты                 | 6(23)       | 4(13)          | 0,789    | 0,575 |
| Возраст (лет)                      | Средний                    | 60,92±11,62 | 61,03±10,39    | 2,005    | 0,295 |
|                                    | Интервал                   | 39-76       | 37-79          |          |       |
| Пол                                | Мужской                    | 12(46)      | 13(43)         | 0,158    | 0,900 |
|                                    | Женский                    | 14(54)      | 17(57)         | 0,141    | 0,911 |
| Употребление табачных изделий      | Да (ранее или по сей день) | 8(31)       | 9(30)          | 0,052    | 0,967 |
|                                    | Нет                        | 6(23)       | 21 (70)        | 1,702    | 0,338 |
|                                    | Воздержались от ответа     | 12(46)      | 0              | –        |       |
| Употребление алкогольной продукции | Да                         | 4(15)       | 4(13)          | 0,203    | 0,873 |
|                                    | Нет                        | 10(39)      | 21(70)         | 1,372    | 0,401 |
|                                    | Воздержались от ответа     | 12(46)      | 5(17)          | 1,479    | 0,378 |

Из клинического материала всех групп для исследования (опухолевая и гистологически нормальная ткань от больных КРР, периферическая кровь от больных КРР и здоровых людей) была выделена ДНК и далее использовалась для молекулярно-генетического анализа метилирования генов опухолевой супрессии *APC*, *MLH1* и *RASSF1A*.

**Анализ метилирования гена *MLH1*.** Ген *MLH1* представлен 19 экзонами, 757 кодонами (57358 нуклеотидных пар) и кодирует белок из 756 аминокислот. Белковый продукт гена участвует в эксцизионной репарации неспаренных оснований (*mismatch repair*, MMR, коррекция неспаренных оснований). Потеря функциональной активности этого гена часто вызвана метилированием его CpG-островка. В данной работе был исследован статус метилирования промотора гена *MLH1* при развитии колоректального рака методом метил-чувствительной ПЦР.

Продукты метил-чувствительной полимеразной цепной реакции были проанализированы в 1,4% агарозном геле с использованием метода электрофореза (рисунок 1).



Marker - GeneRuler 50 bp plus (ThermoFisherScientific, США). I полоса – продукты контрольной амплификации негидролизованного участка промоторной области гена *MLH1* (фрагмент в области 608 bp). II полоса - продукты амплификации гидролизованного HpaI участка промоторной области гена *MLH1*, положительный сигнал (фрагмент в области 608 bp) должен указывать на метилирование промоторной области гена *MLH1* (образец KPT4).

Рисунок 1 – Анализ метилирования промоторной области гена *MLH1* в образцах опухолевой ткани кишечника, электрофорез в 1,4% геле

В результате анализа были получены следующие результаты: для 15 образцов опухолевой ткани кишечника из 50 обследованных было показано метилирование промоторной области гена *MLH1*, что составило 30%. Кроме того, у 1 пациента с диагнозом рак прямого кишечника III стадия Т3NХМ0 помимо метилирования промотора *MLH1* 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. Однако стоит учитывать, что наличие метилирования в прилежащей к опухоли ткани может быть связано и с контаминацией исследуемого материала опухолевыми клетками. Из 26 обследованных образцов периферической крови от пациентов с КРР метилирование было обнаружено в 1 случае (4%), при этом в образцах опухолевой ткани этого же пациента данное эпигенетическое изменение обнаружено не было. 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. В ДНК крови 30 представителей контрольной группы метилирование промоторного района гена *MLH1* не было определено.

Статистический анализ показал, что метилирование промотора *MLH1* в ткани кишечника ассоциируется с риском развития КРР (OR = 3,000; 95% CI = 0.538-21,773; P = 0,288).

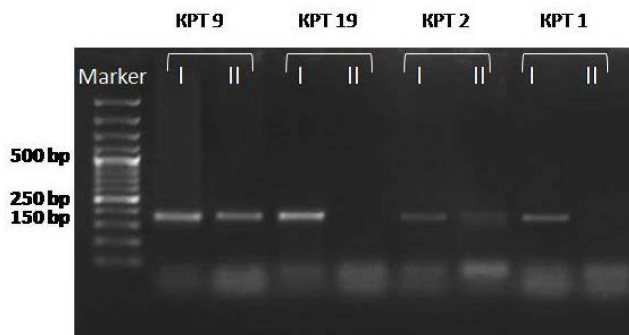
Анализ диагностических характеристик теста на метилирование промоторной последовательности гена *MLH1* в ткани кишечника для выявления КРР дал следующие результаты: чувствительность - 30,00%, специфичность - 87,50%, прогностическая ценность положительного результата - 88,24% и отрицательного результата - 28,57%, диагностическая эффективность теста -

43,93%. Аналогичные характеристики при проведении теста на метилирование *MLH1* в периферической крови следующие: чувствительность - 3,85%, специфичность - 100,00%, прогностическая ценность положительного результата - 100,00% и отрицательного результата - 54,55 %, диагностическая эффективность теста - 46,43%.

К настоящему времени в литературе накопилось достаточно исследований, посвященных данной теме. В целом, литературный анализ данных показывает, что частота метилирования гена *MLH1* при sporadическом колоректальном раке в проведенных исследованиях варьирует от 0% [7] до 66.9% [8]. В нашем исследовании частота метилирования промотора гена *MLH1* в опухолевой ткани кишечника составила 30%. Таким образом, данные нашего исследования совпадают с результатами других исследований и указывают на перспективность изучения метилирования промотора гена *MLH1* в качестве маркера колоректального рака.

**Анализ метилирования гена *RASSF1A*.** Ген *RASSF1A* (Ras-association domain family 1 isoform A) располагается в кластере связанных с канцерогенезом генов в районе 3p21.31. Этот ген протяженностью 7.6 т.п.н. содержит 5 экзонов. Выявлено многообразие функций белка *RASSF1A* в клетке: задержка клеточного цикла в фазе G1/S-перехода, индукция апоптоза и стабилизация микротрубочек. В качестве основного способа подавления супрессорной функции гена при онкогенезе рассматривают метилирование гена *RASSF1A* [9]. В данном исследовании проведен анализ метилирования гена *RASSF1A* при развитии колоректального рака методом метил-чувствительной ПЦР со специфичными праймерами.

Продукты метил-чувствительной полимеразной цепной реакции были проанализированы в 1,4% агарозном геле с использованием метода электрофореза (рисунок 2).



Marker - GeneRuler 50 bp plus (ThermoFisherScientific, США). U полоса – продукты контрольной амплификации негидролизованного участка промоторной области гена *RASSF1A* (фрагмент в области 150 bp). M - продукты амплификации гидролизованного HinfI участка промоторной области гена *RASSF1A*, положительный сигнал (фрагмент в области 150 bp) должен указывать на метилирование промоторной области гена *RASSF1A* (образец KPT9, KPT2).

Рисунок 2 – Анализ метилирования промоторной области гена *RASSF1A* в образцах опухолевой ткани кишечника, электрофорез в 1,4% геле

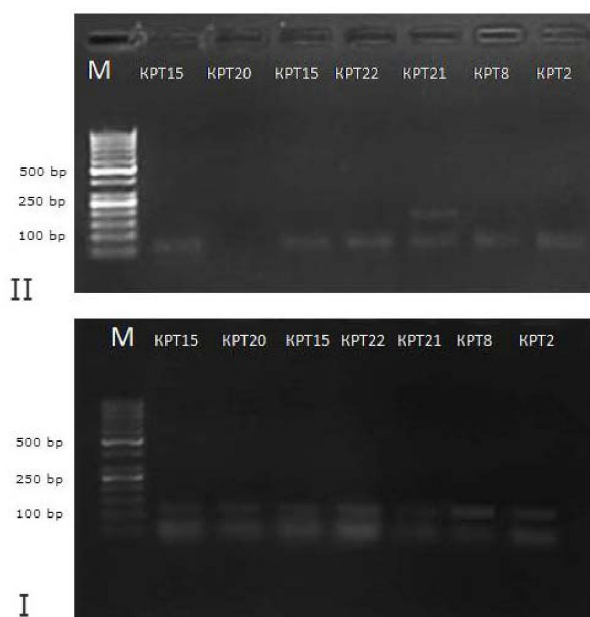
В результате анализа были получены следующие результаты: для 5 образцов опухолевой ткани кишечника из 50 исследованных было показано метилирование промоторной области гена *RASSF1A*, что составило 10%. Метилирование гена *RASSF1A* не было обнаружено в 16 исследованных образцах непораженных тканей кишечника от онкобольных, в 26 образцах периферической крови от онкобольных и 30 образцах периферической крови от условно здоровых людей контрольной группы.

Анализ диагностических характеристик теста на метилирование промоторной последовательности гена *RASSF1A* в ткани кишечника для выявления КРР дал следующие результаты: чувствительность - 10,00%, специфичность - 100,00%, прогностическая ценность положительного результата - 100,00% и отрицательного результата - 26,23%, диагностическая эффективность теста - 31,81%. Аналогичные характеристики для теста на метилирование *RASSF1A* в периферической крови не имеют особой значимости в связи с отсутствием метилирования этого гена в исследованных образцах крови как группы КРР, так и контрольной группы.

В отношении колоректального рака проведено достаточно исследований по его ассоциации с метилированием гена *RASSF1A*. По данным различных зарубежных исследований частота его метилирования при КРП составляет от 12 [185] до 81% [186]. Наши данные по частотам метилирования гена *RASSF1A* согласуются с результатами других исследований и свидетельствуют о возможности использования этого маркера для диагностики КРП.

**Анализ метилирования гена *APC*.** *APC*-ген (adenomatous polyposis coli) располагается в длинном плече 5-й хромосомы в локусе 5q21-g22. Ген содержит 15 экзонов (8535 нуклеотидных пар) и кодирует белок с молекулярной массой 310 кДа, состоящий из 2843 аминокислотных остатков. Синтезируемый белок АРС является составляющей сигнального каскада *Wnt*, участвует в процессах клеточной адгезии, миграции клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и сегрегации хромосом.

Помимо мутаций нарушение функций гена *APC* при канцерогенезе могут происходить за счет метилирования его промоторной области. В данной работе был исследован статус метилирования промотора 1А гена *APC* при развитии колоректального рака методом метил-специфичной ПЦР с двумя парами праймеров. По тому, с какой парой праймеров проходит амплификация, можно судить о наличии метилирования в образце (рисунок 3).



М – маркер *GeneRuler 50 bp plus* (ThermoFisherScientific, США). I – продукты амплификации преобразованного бисульфитом участка промотора гена *APC* (неметилированный фрагмент в области 110 bp). II – продукты амплификации непреобразованного бисульфитом участка промотора гена *APC*, положительный сигнал (фрагмент в области 158 bp) указывает на метилирование (образец КРТ 21).

Рисунок 3 – Анализ метилирования промоторной области гена *APC* в образцах опухолевой ткани кишечника, электрофорез в 1,4% геле

В результате анализа были получены следующие результаты: для 2 образцов опухолевой ткани кишечника из 50 обследованных было показано метилирование промоторной области гена *APC* в одном аллеле, что составило 4%. В обоих случаях это были пациенты с диагнозом рак прямой кишки II стадии. Метилирование гена *APC* не было обнаружено в 16 исследованных образцах непораженных тканей кишечника от онкобольных, в 26 образцах периферической крови от онкобольных и 30 образцах периферической крови от условно здоровых людей контрольной группы.

Анализ диагностических характеристик теста на метилирование промоторной последовательности гена *APC* в ткани кишечника для выявления КРП дал следующие результаты: чувстви-

ность - 4,00%, специфичность - 100,00%, прогностическая ценность положительного результата - 100,00% и отрицательного результата - 25,00%, диагностическая эффективность теста - 27,27%. Аналогичные характеристики для теста на метилирование *APC* в периферической крови не имеют особой значимости в связи с отсутствием метилирования этого гена в исследованных образцах крови как группы КРР, так и контрольной группы.

Исследования по ассоциации метилирования промоторов гена *APC* с риском развития колоректального рака многочисленны. Частота метилирования *APC* в ткани в различных исследованиях варьирует в пределах от 18% [10] до 51% [11]. В нашем исследовании частота метилирования гена как в ткани, так и периферической крови *APC* была низкой, по сравнению с вышеперечисленными исследованиями. Возможно, данный факт объясняется тем, что в нашем исследовании был исследован отличный от этих исследований участок промотора гена *APC*. Кроме того, причина может заключаться в популяционных генетических особенностях.

Таким образом, проведен молекулярно-генетический анализ метилирования промоторов генов репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза *MLH1*, *APC* и *RASSF1A* в норме и при развитии колоректального рака. Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности тестов на метилирование генов *APC* и *RASSF1A* в ткани кишечника, гена *MLH1* - в ткани кишечника и периферической крови для диагностики КРР.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Нургазиев К.Ш., Байпеисов Д.М., Ауэзова Э.Т. и др. Показатели онкологической службы РК за 2014 год (статистические материалы). – Алматы, 2015. – С.76-138.
- [2] Kane M.F., Loda M., Gaida G.M. et al. Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines // *Cancer Res.* – 1997. – V.57. – P.808-811.
- [3] Казубская Т.П., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др. Метилирование генов *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* в эпителиальных опухолях молочной железы, яичников и при полинеоплазии // *Опухоли женской репродуктивной системы.* – 2012. – Т.(1). – С. 61-68.
- [4] Tsuchiya T., Tamura G., Sato K. et al. Distinct methylation patterns of two *APC* gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia // *Oncogene.* – 2000. – V.19. – P.3642-3646.
- [5] <http://medstatistic.ru/calculators.html>.
- [6] <http://www.biometrika.tomsk.ru/freq2.htm>
- [7] Belshaw N.J., Elliott G.O., Williams E.A. et al. Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2004. – V.13. – P.1495-1501.
- [8] Kumar K., Brim H., Giardiello F. et al. Distinct *BRAF* (V600E) and *KRAS* mutations in high microsatellite instability sporadic colorectal cancer in African Americans // *Clin Cancer Res.* – 2009. – V.15. – P.1155-1161.
- [9] Dammann R., Schagdarsurengin U., Seidel C. et al. The tumor suppressor *RASSF1A* in human carcinogenesis: an update // *Histol. Histopathol.* – 2005. – V.20(2). – P.645-663.
- [10] Esteller M., Sparks A., Toyota M. et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer // *Cancer Res.* – 2000. – V.60(16). – P.4366-4371.
- [11] Lee S., Hwang K.S., Lee H.J. et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia // *Lab Invest.* – 2004. – V.84(7). – P.884-893.

#### REFERENCES

- [1] Nurgaziev K.S., Baypeisov D.M., Auevov E.T. et al. Indicators of oncology service of Kazakhstan in 2014 (statistical material). – Almaty, 2015. – S.76-138 (in Russ.).
- [2] Kane M.F., Loda M., Gaida G.M. et al. Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines // *Cancer Res.* – 1997. – V.57. – P.808-811.
- [3] Kazubskaya T.P., Loginov V.I., Hodyrev D.S. et al. Methylation of *RASSF1A*, *RARβ2*, *SEMA3B* genes in epithelial tumors of the breast, ovaries and polynoplasia // *Tumors of the female reproductive sistemy.* – 2012. – T.(1). – C.61-68 (in Russ.).
- [4] Tsuchiya T., Tamura G., Sato K. et al. Distinct methylation patterns of two *APC* gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia // *Oncogene.* – 2000. – V.19. – P.3642-3646.
- [5] <http://medstatistic.ru/calculators.html>.

- [6] <http://www.biometrika.tomsk.ru/freq2.htm>
- [7] Belshaw N.J., Elliott G.O., Williams E.A. et al. Use of DNA from human stools to detect aberrant CpG island methylation of genes implicated in colorectal cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2004. – V.13. – P.1495-1501.
- [8] Kumar K., Brim H., Giardiello F. et al. Distinct *BRAF* (V600E) and *KRAS* mutations in high microsatellite instability sporadic colorectal cancer in African Americans // *Clin Cancer Res.* – 2009. – V.15. – P.1155-1161.
- [9] Dammann R., Schagdarsurengin U., Seidel C. et al. The tumor suppressor *RASSF1A* in human carcinogenesis: an update // *Histol. Histopathol.* – 2005. – V.20(2). – P.645-663.
- [10] Esteller M., Sparks A., Toyota M. et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer // *Cancer Res.* – 2000. – V.60(16). – P.4366-4371.
- [11] Lee S., Hwang K.S., Lee H.J. et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia // *Lab Invest.* – 2004. – V.84(7). – P.884-893.

**А. В. Перфильева<sup>1</sup>, С. Е. Әбдікерім<sup>1</sup>, С. А. Қасымұратова<sup>1</sup>, Л. А. Скворцова<sup>1</sup>,  
Г. С. Жүнісова<sup>1</sup>, Э. М. Хусанова<sup>1</sup>, Г. А. Афонин<sup>2,3</sup>, Б. О. Бекманов<sup>1</sup>, Л. Б. Жансүгірова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты», Алматы, Қазақстан,

<sup>2</sup> С. Д. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан,

<sup>3</sup> Алматы онкологиялық орталығы, Алматы, Қазақстан

### **КОЛОРЕКТАЛЬДЫ ІСІКТІҢ ДАМУЫНА *APC*, *MLH1* ЖӘНЕ *RASSF1A* ГЕНДЕРІ МЕТИЛЬДЕНУІНІҢ ӘСЕРІН ТАЛДАУ**

**Аннотация.** Қалыпты жағдайда және колоректальды ісіктің дамуы кезінде репарация, клетка циклінің реттелуі мен апоптозға жауапты *MLH1*, *APC* және *RASSF1A* гендері промоторлық бөліктерінің метильденуіне молекулалы-генетикалық талдаулар жүргізілді. Колоректальды ісікті диагностикалау үшін алынған ішек ұлпасындағы *APC* және *RASSF1A* гендерінің, сонымен қатар ішек ұлпасы мен перифериялық қан үлгілерінен бөлінген *MLH1* генінің промоторлық бөліктеріндегі метильденуге жүргізілген тестілеудің практикалық потенциалы анықталды.

**Түйін сөздер:** колоректальды ісік, ДНҚ метильденуі, эпигенетика.