N E W S
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. Perfilyeva[1], S. E. Abdikerim[1], S. A. Kasimuratova[1], L. A. Skvortsova[1], G. S. Zhunussova[1], E. M. Khussainova[1], G. A. Afonin[2, 3], B. O. Bekmanov[1], L. B. Djansugurova[1]

[1]«Institute of General Genetics and Cytology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,
[2] Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan,
[3]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 promotors 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[1], С. Е. Абдикерим[1], С. А. Касимуратова[1], Л. А. Скворцова[1], Г. С. Жунусова[1], Э. М. Хусаинова[1], Г. А. Афонин[2, 3], Б. О. Бекманов[1], Л. Б. Джансугурова[1]

[1]«Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,
[2]Казахский национальный медицинский университет им. С. Д. Асфендиярова, Алматы, Казахстан,
[3]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 свежезамороженной 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°С и –80°С.

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°С в течение 12 ч. 50 нг гидролизованной и 50 нг негидролизованной ДНК были амплифицированы в 20μl ПЦР смеси, включающей 10μl 2 × *PCR MasterMix* (0.05 U/μL *TaqDNA polymerase*, *reaction buffer*, 4 mM $MgCl_2$, 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 (5′→ 3′)	Размер ПЦР-продукта bp	Температура отжига, °С
MLH1[2]	CGCTCGTAGTATTCGTGC	608 bp	55
	ACCTCAGTGCCTCGTGCTCACGTTC		
RASSF1A [3]	GGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGACGAA	150 bp	64
	GGGCGGCGGGAAGGAGCTGAGGAGA		
1AM1 [4]	TGTTTTGCGGATTTTTTTC	158 bp	60
	GCAATAAAACACAAAACCCCG		
1AU [4]	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	110 bp	
	CCAATCAACAAACTCCCAACAA		