

ISSN 2224-5308

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



**СЕРИЯ
БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ**



**SERIES
OF BIOLOGICAL AND MEDICAL**

3 (315)

МАМЫР – МАУСЫМ 2016 ж.

МАЙ – ИЮНЬ 2016 г.

MAY – JUNE 2016

1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН

ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА

PUBLISHED SINCE JANUARY 1963

ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ

ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД

PUBLISHED 6 TIMES A YEAR

АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

Ж. А. Арзықұлов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы:

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байгулин И.О.** (бас редактордың орынбасары); биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Бишімбаева Н.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Күзденбаева Р.С.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Рахышев А.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ақшолақов С.К.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Алшынбаев М.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Березин В.Э.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Ботабекова Т.К.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Жамбакин К.Ж.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қайдарова Д.Р.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Локшин В.Н.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; мед. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Рахыпбеков Т.К.**

Р е д а к ц и я к ең е с і:

Абжанов Архат (Бостон, АҚШ); **Абелев С.К.** (Мәскеу, Ресей); **Лось Д.А.** (Мәскеу, Ресей); **Бруно Луненфелд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); философия докторы, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Ұлыбритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Ұлыбритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, АҚШ); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, ҚХР)

Главный редактор

академик НАН РК

Ж. А. Арзыкулов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин** (заместитель главного редактора); доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.К. Бишимбаева**; доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **Р.С. Кузденбаева**, доктор мед. наук, проф., академик НАН РК **А.Р. Рахисhev**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **С.К. Акшулаков**, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.К. Алчинбаев**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Э. Березин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Ботабекова**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **К.Ж. Жамбакин**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.Р. Кайдарова**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **В.Н. Локшин**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор мед. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Т.К. Рахыпбеков**

Редакционный совет:

Абжанов Архат (Бостон, США); **С.К. Абелев** (Москва, Россия); **Д.А. Лось** (Москва, Россия); **Бруно Луненфельд** (Израиль); доктор, проф. **Харун Парлар** (Мюнхен, Германия); доктор философии, проф. **Стефано Перни** (Кардиф, Великобритания); **Саул Пуртон** (Лондон, Великобритания); **Сапарбаев Мурат** (Париж, Франция); **Сарбассов Дос** (Хьюстон, США); доктор, проф. **Гао Энджун** (Шэньян, КНР)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская». ISSN 2224-5308

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK (deputy editor); **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **N.K. Bishimbayeva**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.S. Kuzdenbayeva**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **A.R. Rakhishev**, dr. med. sc., prof., academician of NAS RK; **S.K. Akshulakov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.K. Alchinbayev**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.E. Berezin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Botabekova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **K.Zh. Zhambakin**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **D.R. Kaidarova**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **V.N. Lokshin**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **T.K. Rakhypbekov**, dr. med. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

Abzhanov Arkhat (Boston, USA); **S.K. Abelev** (Moscow, Russia); **D.A. Los** (Moscow, Russia); **Bruno Lunenfeld** (Israel); **Harun Parlar**, dr., prof. (Munich, Germany); **Stefano Perni**, dr. phylos., prof. (Cardiff, UK); **Saparbayev Murat** (Paris, France); **Saul Purton** (London, UK); **Sarbassov Dos** (Houston, USA); **Gao Endzhun**, dr., prof. (Shenyang, China)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.
ISSN 2224-5308

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

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 °С 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 содержал не 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> | ССТССТГАТТГГСГГАТАГА | 216 |
| | СССТАГСТАСАТСССГТАСС | |
| <i>SEPT9</i> | ТТГАТСССТСТСАССАСТГС | 185 |
| | ГСАГАТГСГТГСГАТТГАТ | |

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.

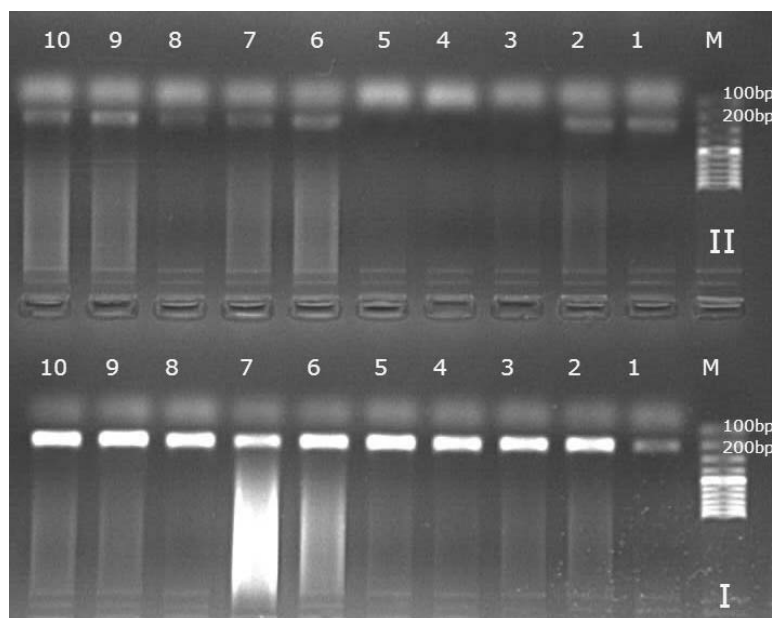
Среди больных КРР 16 (43%) пациентов имели рак толстой кишки, 21 (57%) – прямой кишки. Распределение пациентов с КРР по стадиям было следующим: I–II стадии – 26 (70%) человек, III–IV стадии – 11 (30%) человек.

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_{st} | 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.

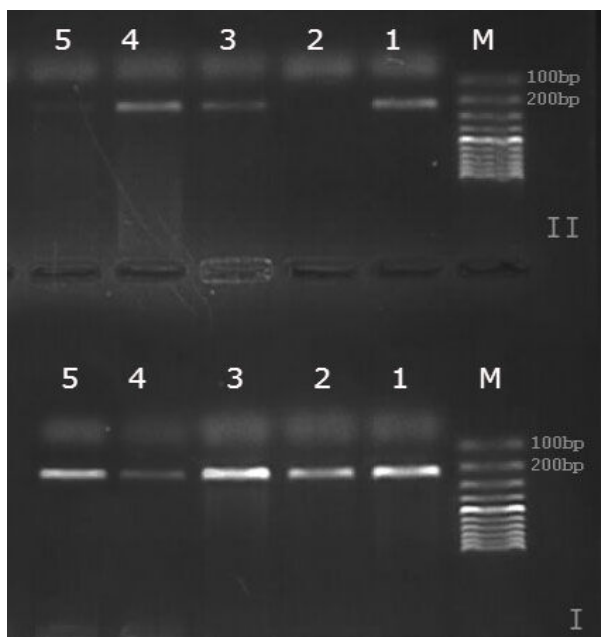
Анализ метилирования гена *SEPT9*. Ген септина 9 (известного также как септиноподобный слитый белок MLL, септиноподобный слитый белок MLLMSF-A, *Slpa*, эсептин, *Msf*, септиноподобный белок яичников/септин молочной железы (септинOv/Br) и септин D1) находится на хромосоме 17q25 и является членом семейства 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 ClinOncol. – 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 ClinOncol*. 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.

Поступила 04.05.2016 г.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 24.05.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
9,5 п.л. Тираж 300. Заказ 3.