

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Института биологии и биотехнологии растений

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
of the Institute of Plant Biology and Biotechnology

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



СЕРИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ



SERIES

OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

2 (320)

НАУРЫЗ – СӘУІР 2017 ж.

МАРТ – АПРЕЛЬ 2017 г.

MARCH – APRIL 2017

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, м. ғ. д., проф.

Ж. А. Арзықұлов

Абжанов Архат проф. (Бостон, АҚШ),
Абелев С.К. проф. (Мәскеу, Ресей),
Айтқожина Н.А. проф., академик (Қазақстан)
Акшулаков С.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Алшынбаев М.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бисенбаев А.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Бишимбаева Н.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ботабекова Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Қайдарова Д.Р. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Күзденбаева Р.С. проф., академик (Қазақстан)
Лось Д.А. prof. (Мәскеу, Ресей)
Lunefeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Қазақстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Қазақстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Сапарбаев Мұрат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, АҚШ)

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz / biological-medical.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2017

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р
академик НАН РК, д.м.н., проф.

Ж. А. Арзыкулов

Абжанов Архат проф. (Бостон, США),
Абелев С.К. проф. (Москва, Россия),
Айтхожина Н.А. проф., академик (Казахстан)
Акшулаков С.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Алчинбаев М.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бисенбаев А.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Бишимбаева Н.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ботабекова Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., чл.-корр. (Казахстан), зам. гл. ред.
Ishchenko Alexander prof. (Villejuif, France)
Кайдарова Д.Р. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Кузденбаева Р.С. проф., академик (Казахстан)
Лось Д.А. prof. (Москва, Россия)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Миербеков Е.М. проф. (Казахстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Казахстан)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Сапарбаев Мурат проф. (Париж, Франция)
Сарбассов Дос проф. (Хьюстон, США)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

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, 2017

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

Editor in chief

academician of NAS RK, doctor of medical science, professor

Zh. A. Arzykulov

Abzhanov Arkhat prof. (Boston, USA),
Abelev S.K. prof. (Moscow, Russia),
Aitkhozhina N.A. prof., academician (Kazakhstan)
Akshulakov S.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Alchinbayev M.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bisenbayev A.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bishimbayeva N.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Botabekova T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Zhambakin K.Zh. prof., corr. member. (Kazakhstan), deputy editor in chief
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Kaydarova D.R. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Kuzdenbayeva R.S. prof., academician (Kazakhstan)
Los D.A. prof. (Moscow, Russia)
Lunefeld Bruno prof. (Israel)
Miyerbekov Ye.M. prof. (Kazakhstan)
Muminov T.A. prof., academician (Kazakhstan)
Purton Saul prof. (London, UK)
Rakhypbekov T.K. prof., corr. member. (Kazakhstan)
Saparbayev Murat prof. (Paris, France)
Sarbassov Dos, prof. (Houston, USA)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

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, 2017

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 2, Number 320 (2017), 160 – 167

A. V. Perfilyeva¹, S. E. Abdikerim¹, S. A. Kasimuratova¹, L. A. Skvortsova¹,
G. S. Zhunussova¹, E. M. Khussainova¹, G. A. Afonin^{2,3}, 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,

³Almaty 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. Перфильева¹, С. Е. Абдикерим¹, С. А. Касимуратова¹, Л. А. Скворцова¹,
Г. С. Жунусова¹, Э. М. Хусайнова¹, Г. А. Афонин^{2,3}, 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,

³Алматинский 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°C и -80°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°C в течение 12 ч. 50 нг гидролизованной и 50 нг негидролизованной ДНК были амплифицированы в 20 μl ПЦР смеси, включающей 10 μl 2 \times *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, $^{\circ}\text{C}$
<i>MLH1</i> [2]	CGCTCGTAGTATTCGTGC	608 bp	55
	ACCTCAGTGCCTCGTGCTCACGTTT		
<i>RASSF1A</i> [3]	GGGGTGGGGTGTGAGGAGGGGACGAA	150 bp	64
	GGGCGGCGGGAAGGAGCTGAGGAGA		
1AM1 [4]	TGTTTTGCGGATTTTTTTTC	158 bp	60
	GCAATAAAACACAAAACCCCG		
1AU [4]	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	110 bp	
	CCAATCAACAACTCCCAACAA		

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 μ л ПЦР смеси, включающей 10 μ л $2 \times$ *PCR MasterMix (0.05 U/ μ L Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 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).

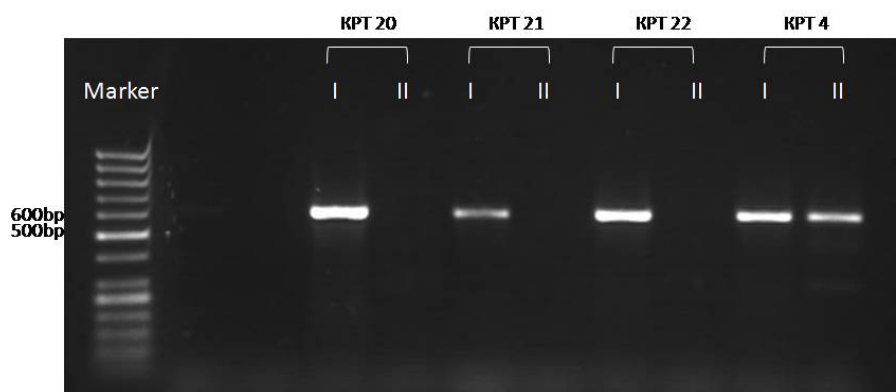
Таблица 2 – Соответствие контрольной группы и группы больных

Характеристика		<i>KPP N (%)</i>	<i>Контроль N (%)</i>	<i>t_{st}</i>	<i>p</i>
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 \pm 11,62	61,03 \pm 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 КРТ4).

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 Т3NXMO 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).

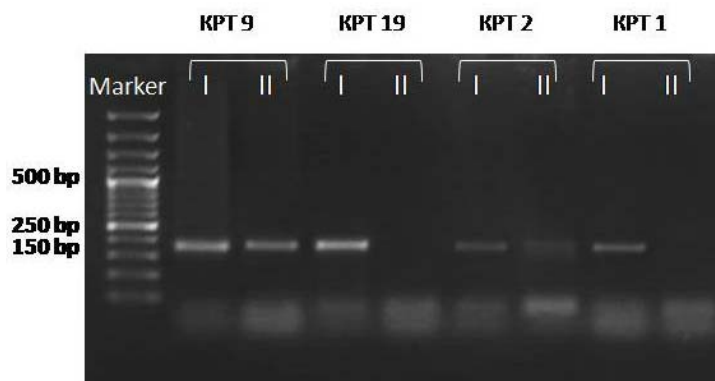
Анализ диагностических характеристик теста на метилирование промоторной последовательности гена *MLH1* в ткани кишечника для выявления КРР дал следующие результаты: чувствительность - 30,00%, специфичность - 87,50%, прогностическая ценность положительного результата - 88,24% и отрицательного результата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

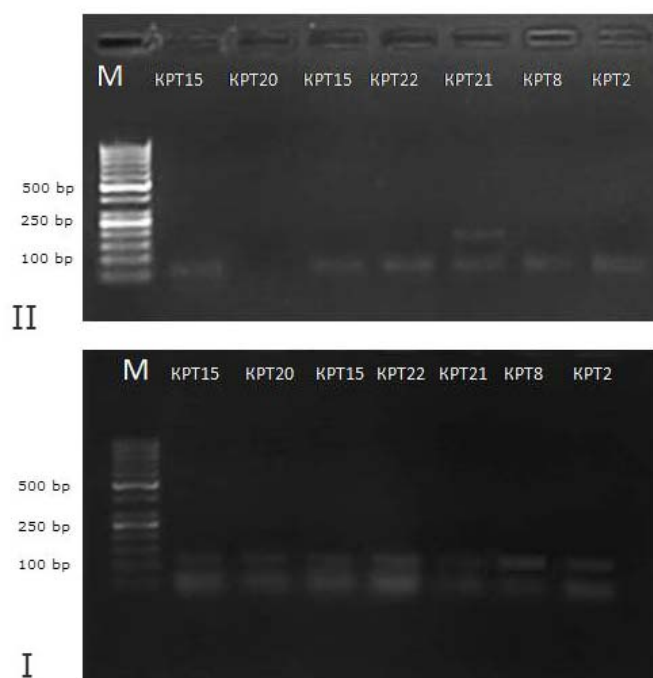
В результате анализа были получены следующие результаты: для 5 образцов опухолевой ткани кишечника из 50 исследованных было показано метилирование промоторной области гена *RASSF1A*, что составило 10%. Метилирование гена *RASSF1A* не было обнаружено в 16 исследованных образцах непораженных тканей кишечника 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 КРП 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 КРП, 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 КРР 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 КРР.

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 APC 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 КРР дал следующие результаты: чувствитель-

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.biometrica.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 polyneoplasia // *Tumors of the female reproductive sistemy.* – 2012. – T.(1). – С.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. Перфильева¹, С. Е. Әбдікерім¹, С. А. Касимуратова¹, Л. А. Скворцова¹,
Г. С. Жүнісова¹, Э. М. Хусаннова¹, Г. А. Афонин^{2,3}, Б. О. Бекманов¹, Л. Б. Жансүгірова¹**

¹ ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты», Алматы, Қазақстан,

² С. Д. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан,

³ 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.

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

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

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

Редактор *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, Т. М. Апендиев*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 06.04.2017.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
16,4 п.л. Тираж 300. Заказ 2.