

УДК 577.2:616-06

GLAD-ПЦР-анализ сайтов метилирования ДНК в регуляторных областях генов-онкосупрессоров при раке желудка

Б. С. Малышев¹, Н. А. Нетесова¹, Н. А. Сметанникова¹, М. А. Абдурашитов², А. Г. Акишев², Е. В. Дубинин^{2*}, А. З. Азанов³, И. В. Вихлянов⁴, М. К. Никитин⁴, А. Б. Карпов⁵, С. Х. Дегтярев^{1,2}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, 630559 Россия

²ООО «ЭпиДжин», Новосибирск, 630090 Россия

³Областной клинический онкологический диспансер, Кемерово, 650036 Россия

⁴Алтайский краевой онкологический диспансер, Алтайский край, Барнаул, 656049 Россия

⁵Северский биофизический научный центр ФМБА России, Томская обл., Северск, 636039 Россия

*E-mail: evgeny.dubinin@epigene.ru

Поступила в редакцию 20.01.2020

Принята к печати 22.07.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11070

РЕФЕРАТ На ранних стадиях канцерогенеза опухолевая ДНК подвергается aberrантному метилированию регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров по сайтам RCGY, служащих субстратом для ДНК-метилтрансферазы Dnmt3. Выявление aberrантно метилированных сайтов в ДНК различных опухолей считается первым шагом в создании эпигенетических ПЦР тест-систем для ранней диагностики онкозаболеваний. Ранее мы разработали метод GLAD-ПЦР, позволяющий определять сайт R(5mC)GY в конкретной позиции генома человека даже в условиях значительного избытка молекул ДНК с неметилированным сайтом RCGY в этой позиции. Цель настоящей работы состояла в определении aberrантно метилированных сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров (*brinp1, bves, cacna2d3, cdh11, cpeb1, epha7, fgf2, galr1, gata4, hopx, hs3st2, irx1, lrcc3b, pcdh10, rprm, runx3, sfrp2, sox17, tcf21, tfpi2, wnt5a, zfp82* и *znf331*) в препаратах ДНК из тканей рака желудка с помощью GLAD-ПЦР-анализа. На образцах ДНК из операционного материала опухолей ($n = 29$) и морфологически неизмененных тканей ($n = 25$) показан высокий диагностический потенциал панели эпигенетических онкомаркеров рака желудка, состоящей из сайтов R(5mC)GY в регуляторных участках генов *irx1, cacna2d3* и *epha7*: суммарные показатели чувствительности и специфичности составляют 96.6 и 100.0% соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак желудка, гены-онкосупрессоры, метилирование ДНК, GLAD-ПЦР-анализ, метилзависимая сайт-специфичная ДНК-эндонуклеаза GlI.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний, занимающее третье место в мире по числу смертельных исходов (более 700 тысяч в год) [1]. По данным ВОЗ, в 2018 году диагностировано свыше 1 млн новых случаев РЖ, а число умерших составило примерно 783 тысячи [2].

Прогноз заболевания в значительной степени зависит от клинической стадии, но в целом остается достаточно неблагоприятным: только у 40% пациентов к моменту постановки диагноза болезнь явля-

ется потенциально излечимой, а общая пятилетняя выживаемость при РЖ в большинстве стран мира не превышает 25–30% [3, 4]. Вместе с тем выявление заболевания на ранней стадии (IA–IB) позволяет увеличить этот показатель до 80% и более [5, 6].

Перспективным инструментом раннего выявления и мониторинга РЖ считается эпигенетическая ДНК-диагностика, включающая определение aberrантно метилированных регуляторных участков генов-онкосупрессоров в опухолевой ДНК, которые инактивируются при такой модификации. Aberrантное метилирование характерно для на-

чальных стадий большинства ненаследственных (спорадических) форм рака, составляющих в среднем более 90% всех случаев злокачественных новообразований [7, 8].

Известно, что метилирование ДНК *de novo*, в том числе и aberrантное, осуществляют ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b, которые узнают преимущественно сайт RCGY (где R – А или G, Y – Т или С) и модифицируют его с образованием последовательности R(5mC)GY в обеих цепях ДНК [5]. В дальнейшем метилирование таких сайтов поддерживается в ходе репликации ДНК-метилтрансферазой Dnmt1 [9].

Метилзависимая сайт-специфичная ДНК-эндонуклеаза Glal узнает и расщепляет именно сайты R(5mC)GY, что делает ее удобным инструментом для изучения метилирования ДНК [10]. На основе уникальной специфичности фермента Glal нами ранее был разработан метод GLAD-ПЦР, позволяющий выявлять сайты R(5mC)GY в геноме даже в условиях значительного избытка молекул ДНК, в которых эти сайты неметилированы [11].

GLAD-ПЦР отличается более высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов в сравнении с общепринятым методом бисульфитного секвенирования ДНК, поскольку бисульфитная конверсия часто сопровождается существенной деградацией ДНК и значительными потерями исследуемого материала [11].

Ранее мы применили метод GLAD-ПЦР для изучения метилирования генов-онкосупрессоров в тканях колоректального рака и выявили aberrантное метилирование сайтов RCGY в генах *fbn1*, *cnrip1*, *adhfe1*, *ryr2*, *sept9l* и *eid3* более чем в 75% образцов опухолевой ДНК [12, 13].

Цель данной работы состояла в применении GLAD-ПЦР-анализа для обнаружения aberrантно метилированных сайтов R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в ДНК из тканей РЖ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для анализа служили образцы ДНК, выделенные из опухолей слизистой желудка, полученных от 29 пациентов в ходе оперативного вмешательства. Во всех случаях диагностирована аденокарцинома желудка различной степени дифференцировки. Пять больных имели I клиническую стадию заболевания (T1N0-1M0, T2N0M0), 11 – II стадию (T1N2-3M0, T2N1-2M0, T3N0-1M0, T4aN0M0), 10 – III стадию (T2N3M0, T3N2-3M0, T4aN1-3M0, T4bN0-3M0), у трех пациентов выявлена IV стадия РЖ (наличие отдаленных метастазов (M1) при любом размере первичной опухоли (T) и наличии или от-

сутствии метастатического поражения регионарных лимфатических узлов (N)).

В качестве сравнительного контроля использовали образцы ДНК, выделенные из фрагментов морфологически неизменной слизистой желудка, взятой у 25 больных на линии резекции – на расстоянии не менее 5 см от макроскопически определяемого края опухоли.

От всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании.

Образцы тканей, полученные при выполнении оперативного вмешательства, помещали в пробирку, содержащую раствор RNA-later, и хранили в течение суток в холодильнике при температуре +4°C, затем переносили в морозильную камеру и хранили при температуре –20°C [12].

Выделение и очистку ДНК проводили методом фенольно-хлороформной экстракции [14].

GLAD-ПЦР-анализ

GLAD-ПЦР-анализ образцов ДНК включал три стадии: 1) гидролиз ДНК ферментом Glal; 2) лигирование полученных гидролизатов ДНК с универсальным адаптером; 3) последующую ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентного зонда и первого праймера, комплементарных целевому участку ДНК, а также второго праймера, соответствующего последовательности адаптера и участку ДНК вблизи определяемого сайта Glal (рис. 1).

Для постановки всех этапов GLAD-ПЦР применяли реагенты производства ООО «Сибэнзайм».

Ферментативный гидролиз ДНК проводили в течение 30 мин при 30°C. Реакционная смесь (объемом 21.5 мкл) включала 9.0 нг ДНК исследуемого образца, 1× SE-буфер TMN (10 мМ Трис-НСl (рН 7.9), 5 мМ MgCl₂, 25 мМ NaCl), 2.0% диметилсульфоксида (ДМСО), 2.0 мкг бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 1.5 ед. акт. эндонуклеазы Glal.

Для лигирования продуктов гидролиза с адаптером (в объеме 30.0 мкл) к каждой пробе добавляли АТФ и универсальный двухцепочечный адаптер (5'-ССТГСТСТТТСАТСГ-3'/3'-pGGACGAGAAAGTAGC-p-5') до конечной концентрации каждого 0.5 мкМ и 240 ед. акт. высокоактивной Т4-ДНК-лигазы. Реакцию проводили в течение 15 мин при 25°C.

На заключительной стадии в реакционную смесь вносили компоненты ПЦР до следующих концентраций в конечном объеме 60.0 мкл: 1× SE-буфер GLAD (50 мМ Трис-SO₄ (рН 9.0), 30 мМ KCl, 10 мМ [NH₄]₂SO₄), 3 мМ MgCl₂, смесь dNTP по 0.2 мМ каждого, 0.1 мкг/мкл БСА, соответствующую смесь двух праймеров и зонда по 0.4 мкМ каждого, 0.05 ед. акт.

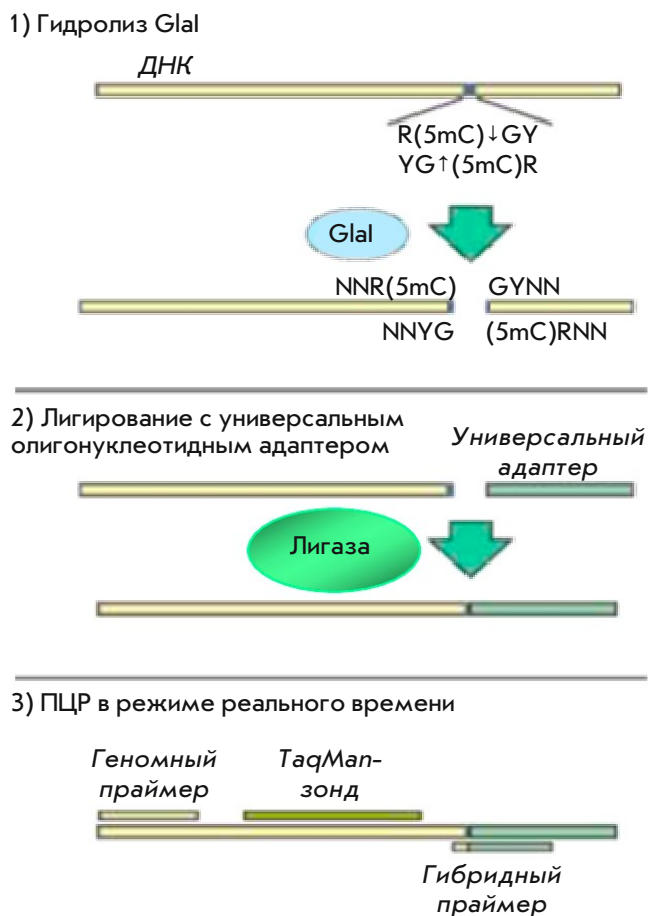


Рис. 1. Схема метода GLAD-ПЦР

SP Taq-ДНК-полимеразы. Для повышения эффективности амплификации GC-богатых участков гена *tfpi2* в ПЦР-смесь дополнительно добавляли ДМСО до концентрации 4%.

Затем по 20.0 мкл полученной смеси переносили в три отдельные микропробирки и проводили ПЦР в режиме реального времени в детектирующем амплификаторе «СХФ-96» (Bio-Rad Lab., США) по программе: 3 мин при 95°C и 45 циклов – 10 с при 95°C, 15 с при 61°C (*bves*, *gata4*, *sox17*, *tcf21*) или при 62°C (*casna2d3*, *galr1*, *hs3st2*, *pcdh10*, *rprm*, *sfrp2*, *wnt5a*), или при 63°C (*cdh11*, *cpeb1*, *fgf2*, *hopx*, *tfpi2*, *zfp82*), 20 с при 72°C. Для устранения влияния возможных начальных флуктуаций на форму кривой амплификации флуоресценцию на первых пяти циклах ПЦР не детектировали.

Подбор специфичных праймеров и зондов

Для подбора специфичных праймеров и зондов анализировали нуклеотидные последовательности, представленные в базе данных GenBank ([\[ncbi.nlm.nih.gov/genbank\]\(http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank\)\), по версии генома человека GRCh38/hg38, семейство программ Vector NTI 11.5 \(Invitrogen, США\) и онлайн-ресурс BLAST \(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>\). Структуры использованных в работе праймеров и зондов приведены в табл. 1.](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

Гибридные праймеры, соответствующие сайтам R(5mC)GY, метилированным с наибольшей частотой, подбирали экспериментально. Каждый такой праймер имеет нуклеотидную последовательность 5'-ССТГСТТТTCATCGGYNN-3', где 15 5'-концевых нуклеотидов соответствуют адаптеру, а четыре 3'-концевых нуклеотида (подчеркнуты) комплементарны геномной последовательности в точке гидролиза ДНК. В регуляторной области каждого гена с применением гибридных праймеров, соответствующих концевым тетра-нуклеотидам, получаемым после гидролиза последовательности NNR(5mC)↓GYNN, проанализированы все сайты RCGY, расположенные в пределах ~200 п.н. от участка гибридизации флуоресцентного зонда. Наименьшее значение порогового цикла (Cq), получаемое в ПЦР в режиме реального времени, указывало на максимальную степень метилирования сайта R(5mC)GY [12, 13].

Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения MedCalc 15.11 (MedCalc Software, Бельгия). Исходя из значений Cq образцов ДНК для анализируемых сайтов RCGY получали характеристические кривые (ROC-кривые; Receiver Operating Characteristic Curves) с 95% доверительным интервалом. Величина площади под ROC-кривой (ППК) отображает взаимосвязь чувствительности и специфичности диагностического теста. ППК является интегральным показателем диагностической эффективности сайта-онкомаркера (в «идеальном» тесте ППК = 1) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение кандидатных генов-онкомаркеров рака желудка

К настоящему времени показано, что развитие РЖ ассоциировано с эпигенетической инактивацией целого ряда генов. По опубликованным данным мы сформировали исходную панель из 23 генов-онкосупрессоров, сайты RCGY в регуляторных областях которых мы исследовали методом GLAD-ПЦР. Эта панель включает гены *brinp1* [16], *bves* [17], *casna2d3* [18], *cdh11* [16], *cpeb1* [19], *epha7*, *fgf2*, *galr1* [16], *gata4* [20], *hopx* [21], *hs3st2* [16], *irx1* [17], *lrrc3b* [22], *pcdh10* [23], *rprm* [24], *runx3*, *sfrp2* [17], *sox17* [25], *tcf21* [26], *tfpi2* [27], *wnt5a* [17], *znf331* [28] и *znf545* [29].

Таблица 1. Структуры праймеров и флуоресцентных зондов, используемых для GLAD-ПЦР-анализа генов-онко-маркеров РЖ

Ген ^а	Кодируемый белковый продукт ^а	Локализация гена в хромосоме ^а	Последовательность первого праймера и флуоресцентного зонда ^б
<i>brinp1</i>	BMP / retinoic acid inducible neural specific 1	9q33.1	FAM-CCGTAAGTCCCCTTCGCTGGTCCC-BHQ1 GAGCCGGGATTCATGCCTGTC
<i>bves</i>	Blood vessel epicardial substance	6q21	CCGGCGGCATTCGTCGTT FAM-CCCTACCCGGACCGCACTTCTCGAA-BHQ1
<i>casna2d3</i>	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3	3p21.1-p14.3	FAM-CGCACTCGGGAAAAGCACTAAGAGCCTC-BHQ1 CGAGGGAGAAGGACTGCTACCGA
<i>cdh11</i>	Cadherin 11	16q21	CGCTCCAGCTGGCCAGGC FAM-CTTCCCCCAACCACCATCCCGGC-BHQ1
<i>cpeb1</i>	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1	15q25.2	CTGCCCTGGGCTCAGTTTCC FAM-CCCCTGCGAGCGGCGGCG-BHQ1
<i>epha7</i>	EPH receptor A7	6q16.1	FAM-CCAAGCACGGAGCCCGACAGTGA-BHQ1 CCCAGCCCCGCGGAGGTTT
<i>fgf2</i>	Fibroblast growth factor 2	4q28.1	CGGGGTCCGGGAGAAGAGC FAM-CCGACCCGCTCTCTCCGCTCAT-BHQ1
<i>galr1</i>	Galanin receptor 1	18q23	FAM-TGCAGCAGAGAAGCCCTGGCACC-BHQ1 GGCGAGAGCTCTTTTGGGAGGC
<i>gata4</i>	GATA binding protein 4	8p23.1	CCTTTCTGGCCGCTCCT FAM-AGTCCCTGGACCCAGCCCCGA-BHQ1
<i>hopx</i>	HOP homeobox	4q12	CGGGCAGAAGCGATGGGAGA FAM-CCCGCCGGCTGCCCTCC-BHQ1
<i>hs3st2</i>	Heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 2	16p12.2	GCCTCCCGGAGGAGTACTATGCC FAM-CACCTTCGTTTACCCGCCCAAAGC-BHQ1
<i>irx1</i>	Iroquois homeobox 1	5p15.33	GCCAGGGAGCGGGTAGCGA FAM-CTCCACGGGCTGCTTCTGCGG-BHQ1
<i>lrrc3b</i>	Leucine rich repeat containing 3B	3p24.1	FAM-TGCTCACCCGCTGTGCAACTG-BHQ1 GGGCTGGGGGAAGGCAAA
<i>pcdh10</i>	Protocadherin 10	4q28.3	CCGGCCCTGTATCTCTGGTGTC FAM-CCGCCATCTCTGCTCCACAACG-BHQ1
<i>rprm</i>	Reprimo, TP53 dependent G2 arrest mediator homolog	2q23.3	CCCCGTTCAAATTCGCAGGC FAM-CCCCCACCCCTTCTCCACAATGA-BHQ1
<i>runx3</i>	Runt related transcription factor 3	1p36.11	FAM-CCCTCCCAACTGTAGCCGGCCCC-BHQ1 CTGGGGCGATAATTCGGAATGA
<i>sfrp2</i>	Secreted frizzled related protein 2	4q31.3	FAM-CTCCCTTGCTCCCCCACCTCC-BHQ1 CCAGCCCTCCTCGGATTACCC
<i>sox17</i>	SRY (sex determining region Y)-Box 17	8q11.23	CGCCCTCCGACCCTCAA FAM-TCCCGGATTCCCCAGGTGGCC-BHQ1
<i>tcf21</i>	Transcription factor 21	6q23.2	FAM-TGCCCCCGACACCAAGTCTTCC-BHQ1 CCAGCCTGAGCGTGTCCAGC
<i>tfpi2</i>	Tissue factor pathway inhibitor 2	7q21.3	CCGAGCGGAGGGGCTCT FAM-AGCGAGTCCCCCTGCCAGCG-BHQ1
<i>wnt5a</i>	Wnt family member 5A	3p14.3	FAM-CCCTTCCCTGCCCTCCCCACAGC-BHQ1 CAGGTGTGGGGTGGGAGGGA
<i>zfp82</i>	Zinc finger protein 82	19q13.12	FAM-CAGCTGCAGAGAAATGGCCCTCGGTC-BHQ1 CCCCAGCATCCTTGTCCAC
<i>znf331</i>	Zinc finger protein 331	19q13.42	FAM-CCGCACACTCGCTGGCCCTTTTAC-BHQ1 GCCCGATCCCGACCAGTCAC

^аОбозначение, хромосомная локализация генов и наименования конечных белковых продуктов приведены согласно указаниям Международного комитета по номенклатуре генов – HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org>).

^бВ последовательности флуоресцентных зондов FAM – 6-карбоксифлуоресцеин, BHQ1 – Black Hole Quencher 1.

Таблица 2. Сайты RCGY, выбранные для GLAD-ПЦР-анализа, их локализация в геноме и последовательности соответствующих им гибридных праймеров

Ген	Сайт	Координаты сайта ^а	Гибридный праймер ^б
<i>brinp1</i>	GCGC	chr9:119369161-119369164	CCTGCTCTTTTCATCGGCGG
<i>bves</i>	GCGC	chr6:105137614-105137617	CCTGCTCTTTTCATCGGCGC
<i>casna2d3</i>	GCGC	chr3:54120898-54120901	CCTGCTCTTTTCATCGGCGA
<i>сreb1</i>	GCGC	chr15:82648343-82648347	CCTGCTCTTTTCATCGGCGG
<i>epha7</i>	GCGC	chr6:93419955-93419958	CCTGCTCTTTTCATCGGCGA
<i>galr1</i>	GCGC	chr18:77249828-77249831	CCTGCTCTTTTCATCGGCGG
<i>irx1</i>	GCGC	chr5:3596424-35966427	CCTGCTCTTTTCATCGGCGG
<i>lrrc3b</i>	GCGC	chr3:26623493-26623500	CCTGCTCTTTTCATCGGCGG
<i>pcdh10</i>	GCGT	chr4:133152953-133152956	CCTGCTCTTTTCATCGGCGA
<i>runx3</i>	GCGT	chr1:24931357-24931360	CCTGCTCTTTTCATCGGTGG
<i>sfrp2</i>	GCGC	chr4:153789030-15379033	CCTGCTCTTTTCATCGGCGC
<i>tcf21</i>	GCGC	chr6:133889653-133889658	CCTGCTCTTTTCATCGGCGA
<i>tfpi2</i>	GCGC	chr7:93890478-93890481	CCTGCTCTTTTCATCGGCGC
<i>znf331</i>	GCGT	chr19:53521737-53521740	CCTGCTCTTTTCATCGTCT

^а Координаты сайта приведены в соответствии с последней сборкой генома человека GRCh38/hg38.

^б Подчеркнут 3'-концевой тетрауклеотид гибридного праймера, комплементарный последовательности ДНК в точке гидролиза ферментом Glal.

Выявление сайтов RCGY в ДНК из тканей РЖ, перспективных для GLAD-ПЦР-анализа

На первом этапе использовали случайную выборку из 10 препаратов опухолевой ДНК, выделенных из тканей РЖ, с помощью которой отобрали наиболее часто метилированные сайты RCGY в пределах регуляторных областей генов-онкосупрессоров как описано ранее [12, 13].

В качестве критерия отбора сайтов RCGY, перспективных для проведения GLAD-ПЦР-анализа, использовали значение Cq, которое не должно превышать 30 по меньшей мере у одного из 10 образцов. По результатам предварительного анализа для дальнейшего исследования всей коллекции образцов ДНК опухолевых ($n = 29$) и морфологически неизмененных тканей ($n = 25$) больных РЖ отобрали по одному сайту RCGY в составе генов *brinp1*, *bves*, *casna2d3*, *сreb1*, *epha7*, *galr1*, *irx1*, *lrrc3b*, *pcdh10*, *runx3*, *sfrp2*, *tcf21*, *tfpi2* и *znf331* (табл. 2).

GLAD-ПЦР-анализ сайтов метилирования в препаратах ДНК из клинических образцов

GLAD-ПЦР-анализ выбранных сайтов RCGY выполняли в трех повторах, каждый из которых содержал 3.0 нг ДНК (~10³ копий исследуемого участка гена). Диаграммы на рис. 2 отображают средние значения Cq для исследованных сайтов.

Результаты анализа сайтов R(5mC)GY в генах *bves*, *casna2d3*, *сreb1*, *epha7*, *galr1* и *tfpi2* показывают, что значения Cq (23–27) для большинства образцов опухолевой ДНК в среднем на три и более цикла

ниже значений Cq для соответствующих образцов ДНК из здоровых тканей. В то же время у маркеров *brinp1*, *lrrc3b*, *runx3*, *tcf21* и *znf331* это различие в значении Cq для основной части образцов ДНК невелико (менее 1.5 цикла), что затрудняет их использование для выявления опухолевой ткани из-за возможного перекрытия диапазона стандартных отклонений.

На рис. 3 показаны ROC-кривые, полученные при статистической обработке данных GLAD-ПЦР 14 сайтов RCGY, а в табл. 3 представлены значения рассчитанных параметров. В столбцах 2 и 3 указано количество положительных результатов для опухолевых тканей по каждому гену и соответственно чувствительность определения по данному сайту. В столбцах 4 и 5 приведено число отрицательных результатов при проведении GLAD-ПЦР-анализа образцов ДНК из морфологически неизмененных тканей и соответственно специфичность выявления опухолевой ДНК. В столбце 6 указана величина площади под ROC-кривой (ППК), выраженная в виде доли от всей площади квадрата с указанием стандартной ошибки измерения, а в столбце 7 представлены значения 95% доверительного интервала определения данного параметра.

Статистический анализ результатов GLAD-ПЦР (рис. 3 и табл. 3) показывает, что большинство проверенных маркеров характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, и позволяет дифференцировать образцы ДНК из опухолевых и нормальных тканей РЖ. Полученные значе-

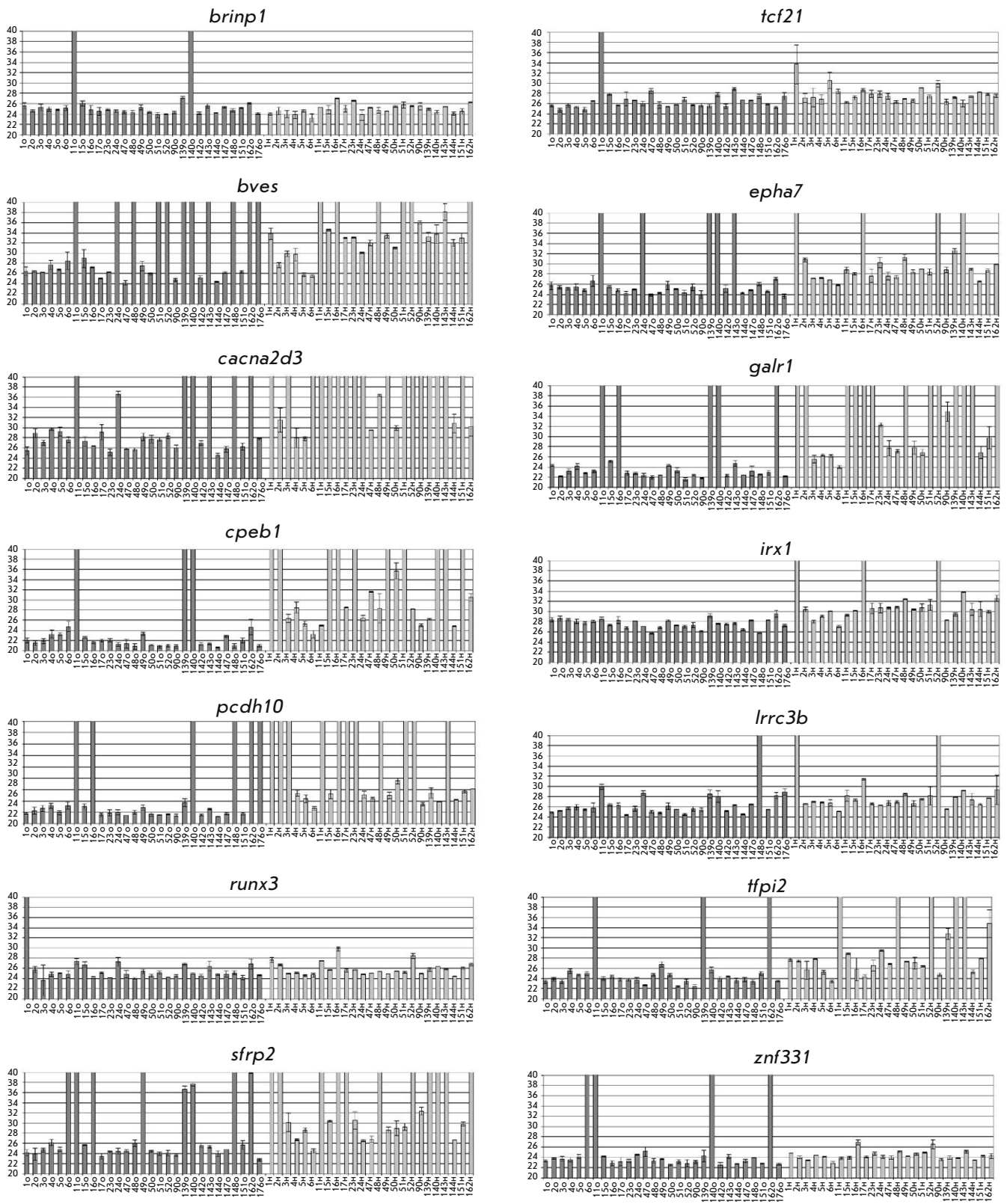


Рис. 2. Результаты GLAD-ПЦР-анализа выбранных R(5mC)GY-сайтов в препаратах ДНК из образцов тканей больных РЖ. По оси ординат приведены значения C_q с диапазонами стандартных отклонений, по оси абсцисс – номера исследованных образцов тканей (о – опухоль, н – неизменная ткань на линии резекции)

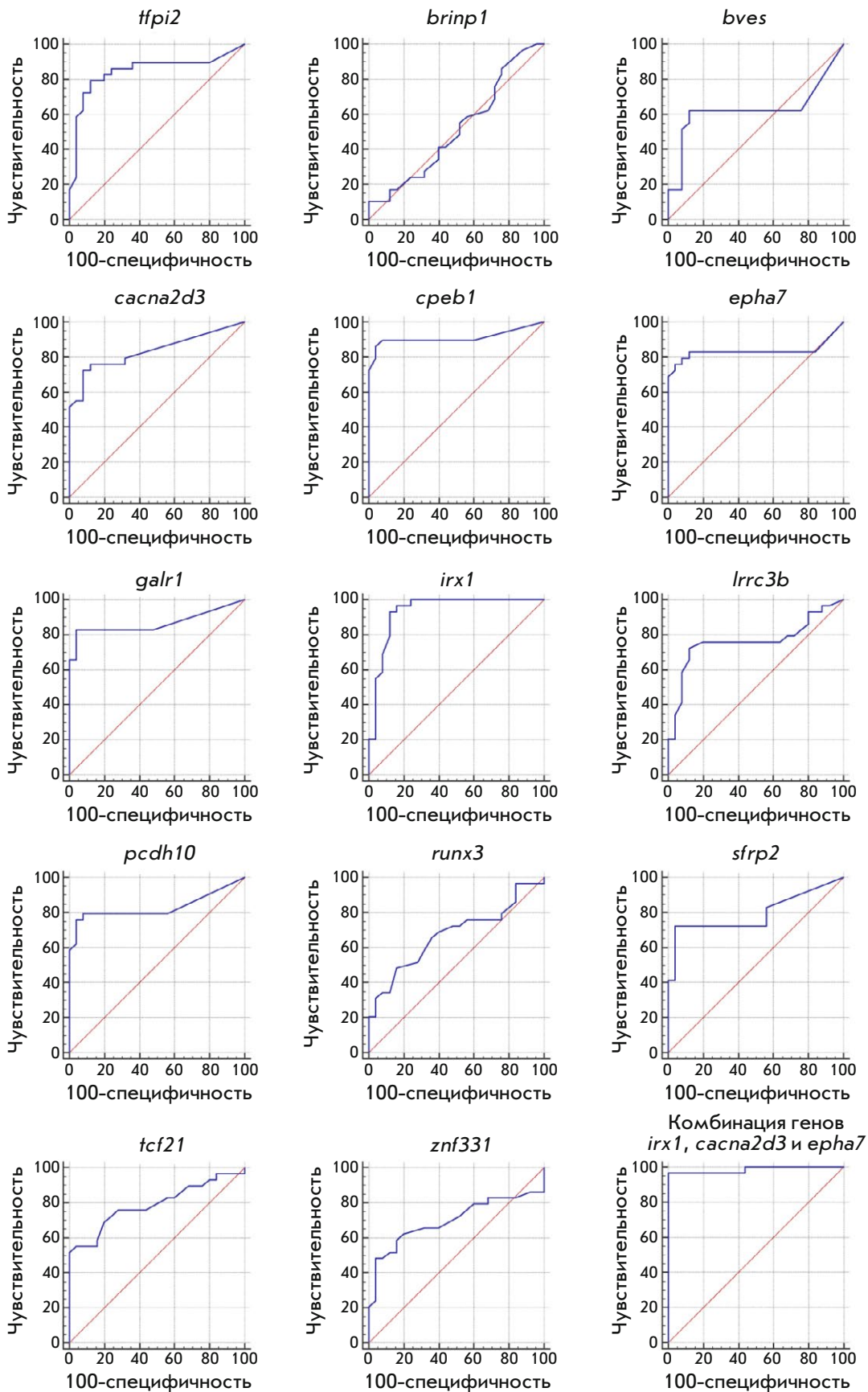


Рис. 3. ROC-кривые, полученные при статистическом анализе данных GLAD-ПЦР-анализа сайтов R(5mC)GY в препаратах ДНК из опухолевых и неизмененных тканей больных РЖ. По оси ординат указана чувствительность в %, по оси абсцисс приведено значение [100 – специфичность (%)]

Таблица 3. Результаты ROC-анализа данных, полученных методом GLAD-ПЦР образцов ДНК из опухолевых и морфологически неизмененных тканей больных РЖ (в порядке уменьшения значений ППК)

Ген	Образцы РЖ, определенные как положительные / общее число образцов РЖ	Чувствительность, %	Образцы морфологически неизмененных тканей, определенных как отрицательные / общее число образцов морфологически неизмененных тканей	Специфичность, %	ППК (стандартная ошибка)	95% доверительный интервал
<i>irx1</i>	27/29	93.1	22/25	88.0	0.934 (0.038)	0.833–0.984
<i>creb1</i>	25/29	86.2	24/25	96.0	0.911 (0.047)	0.802–0.971
<i>galr1</i>	24/29	82.7	24/25	96.0	0.866 (0.054)	0.745–0.943
<i>tfpi2</i>	23/29	79.3	22/25	88.0	0.846 (0.059)	0.721–0.929
<i>casna2d3</i>	21/29	72.4	23/25	92.0	0.834 (0.054)	0.708–0.921
<i>epha7</i>	22/29	75.7	24/25	96.0	0.832 (0.066)	0.706–0.920
<i>pcdh10</i>	22/29	75.9	24/25	96.0	0.830 (0.061)	0.703–0.918
<i>sfrp2</i>	21/29	72.4	24/25	96.0	0.795 (0.064)	0.663–0.893
<i>pcf21</i>	15/29	51.7	25/25	100.0	0.790 (0.063)	0.657–0.889
<i>lrrc3b</i>	21/29	72.4	22/25	88.0	0.762 (0.070)	0.627–0.867
<i>znf331</i>	14/29	48.3	24/25	96.00	0.698 (0.075)	0.558–0.815
<i>runx3</i>	14/29	48.3	21/25	84.0	0.673 (0.074)	0.532–0.795
<i>bves</i>	18/29	62.1	22/25	88.0	0.627 (0.082)	0.485–0.755
<i>brinp1</i>	3/29	10.3	25/25	100.0	0.514 (0.081)	0.374–0.652
Комбинация генов <i>irx1</i> , <i>casna2d3</i> и <i>epha7</i>	28/29	96.6	25/25	100.0	0.985 (0.016)	0.907–1.000

ния ППК (за исключением генов *znf331*, *runx3*, *bves* и *brinp1*) больше 0.7, что, согласно общепринятым критериям оценки данных ROC, свидетельствует о возможности их использования в качестве диагностических моделей [15].

Наиболее высоким диагностическим потенциалом обладают сайты RCGY в составе генов-онкосупрессоров *irx1* и *creb1*: значения ППК для них превышают 0.91.

С применением метода логистической регрессии (алгоритм последовательного включения / исключения) проведена оценка общих диагностических характеристик всех исследованных сайтов RCGY, что позволило отобрать оптимальную комбинацию маркеров, дающую максимальную площадь под ROC-кривой и позволяющую различать образцы ДНК из опухолевых и нормальных тканей с наибольшей эффективностью. Как видно из табл. 3, анализ комбинации маркеров *irx1*, *casna2d3* и *epha7* позволяет проводить такую дифференциацию со 100% специфичностью и чувствительностью 96.6%.

Таким образом, с помощью GLAD-ПЦР-анализа

препаратов ДНК из клинических образцов опухолевых и нормальных тканей больных РЖ сформирована диагностическая панель сайтов RCGY, позволяющая выявлять опухолевые ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известны четыре молекулярных подтипа РЖ, которые различаются профилем метилирования ДНК [17]. В них входят: а) ВЭБ-позитивный, ассоциированный с вирусом Эпштейна–Барр; б) MSI (*mlh1* silencing), характеризующийся функциональной инактивацией локуса *mlh1*; в) вариант со стабильными микросателлитными повторами; г) подтип с большим числом мутаций в микросателлитных повторах. Однако в подавляющем большинстве случаев (> 90%) гистологическим типом РЖ является аденокарцинома.

В настоящее время выявлено значительное количество генов с различными биологическими функциями, районы промотора или первого экзона в которых метилируются при РЖ [30]. При этом метилирование регуляторных областей генов *bves*, *irx1*, *runx3*, *casna2d3*, *lrrc3b* и *sfrp2*, представленных в табл. 3,

ассоциировано по меньшей мере с тремя подтипами РЖ [17]. При исследовании метилирования ДНК на уровне генома используется метод бисульфитной конверсии с последующим секвенированием на NGS-платформе. J.L. Sepulveda и соавт. применили этот подход к исследованию препаратов ДНК из нормальной слизистой и опухолевой ткани и показали существенное увеличение метилирования CpG-динуклеотидов в генах *brinp1*, *epha7* и *galr1* при РЖ [16].

Выводы, сделанные в перечисленных исследованиях, основывались на сравнении медианных значений степени метилирования в выборках образцов тканей без определения частотных показателей метилирования или экспрессии генов для групп «норма» и «опухоль». Такие показатели описаны для остальных пяти генов, представленных в табл. 3.

Выключение гена *creb1* при метилировании промотора наблюдали во всех девяти изученных клеточных линиях РЖ и в 91% первичных опухолей [19]. Похожие результаты получены для гена *pcdh10*, метилирование которого находят в 82% случаев опухолей желудка и в 94% линий опухолевых клеток желудка [23]. Также более чем в 80% образцов опухолей желудка выявлено метилирование промотора гена *tfpi2* [27]. В 71% клеточных линий РЖ установлено выключение гена *znf331*. Этот эффект наблюдали и в значительном количестве образцов ДНК из опухолевых тканей, тогда как в морфологически неизмененных тканях, включая ткань желудка, этот ген не был метилирован [28]. Метилирование промоторной области гена *tcf21* наблюдали только в 65% случаев [26]. Результаты, представленные в табл. 3, хорошо коррелируют с ранее полученными количественными данными по метилированию генов в опухолях РЖ [19, 23, 26–28].

Список генов с aberrантно метилированными сайтами в опухолях РЖ (табл. 3) существенно отличается от списка генов при колоректальном раке, полученного нами ранее [13]. Исключением является ген *sfrp2*, метилирование регуляторной области которого в опухолевой ДНК наблюдается в обоих случаях с практически одинаковой частотой (72% при колоректальном раке).

Возможности GLAD-ПЦР-анализа для диагностики рака желудка

Результаты, полученные в настоящей работе, соответствуют ранее опубликованным данным и по-

казывают, что GLAD-ПЦР позволяет выявлять aberrантно метилированные сайты R(5mC)GY в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в образцах ДНК, выделенных из тканей РЖ. При этом степень метилирования сайта связана отрицательной корреляционной зависимостью со значением S_q в ПЦР в режиме реального времени.

Наиболее оптимальным комплексным маркером РЖ оказалась комбинация сайтов RCGY в регуляторных областях генов *irx1*, *casna2d3* и *epha7*. Применение данной панели генов делает специфичность дифференциации опухолевых и морфологически неизмененных тканей равной 100%, а чувствительность анализа при этом повышается до 96.6% (табл. 3).

В настоящее время наиболее перспективным и активно разрабатываемым методом онкодиагностики является так называемая «жидкая биопсия», основанная на анализе свободно циркулирующей ДНК в крови. Один из основных источников такой ДНК при онкологических заболеваниях – опухолевые клетки, разрушающиеся в результате апоптоза и некроза [31]. В дальнейшем планируется провести тестирование подобранной панели эпигенетических маркеров на образцах ДНК из крови больных РЖ с целью разработки чувствительного метода лабораторной диагностики данной онкопатологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом GLAD-ПЦР определены сайты R(5mC)GY, возникающие при aberrантном метилировании регуляторных областей генов-онкосупрессоров в образцах ДНК из тканей РЖ. Предложена панель сайтов в генах *irx1*, *casna2d3* и *epha7*, являющихся эпигенетическими маркерами РЖ, показана высокая диагностическая эффективность этой панели при дифференциации ДНК из морфологически неизмененных и опухолевых тканей. Суммарные показатели чувствительности и специфичности панели составляют 96.6% и 100% соответственно. Мы полагаем, что выбранные сайты RCGY могут использоваться также для разработки систем диагностики РЖ методом GLAD-ПЦР образцов ДНК, выделенных из крови пациентов. ●

Работа проведена при финансовой поддержке гранта фонда Сколково № Г102/16 от 06 декабря 2016 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IARC. / Eds Stewart B.W., Wild C.P. World Cancer Report 2014. Geneva: WHO Press, 2014.
2. IARC. Press release № 263. WHO, Geneva, Switzerland, 2018.

<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>. Accessed 25 Sep 2019.

3. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. // CA Cancer J. Clin. 2014. V. 64. № 1. P. 9–29.

4. Cancer.net. Doctor-approved patient information from ASCO. <https://www.cancer.net/cancer-types/stomach-cancer/statistics>. Accessed 25 Sep. 2019.
5. International medical center ONCLINIC. https://www.onclinic.ru/articles/za_bolevaniya_onkologiya_vyzhivaemost_pri_rake_zheludka. Accessed 25 Sep. 2019.
6. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. Accessed 25 Sep. 2019.
7. de Cáceres I., Cairns P. // *Clin. Transl. Oncol.* 2007. V. 9. № 7. P. 429–437.
8. Langevin S.M., Kratzke R.A., Kelsey K.T. // *Transl. Res.* 2015. V. 165. № 1. P. 74–90.
9. Handa V., Jeltsch A. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. № 5. P. 1103–1112.
10. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. // *BMC Mol. Biol.* 2008. V. 9. P. 7.
11. Кузнецов В.В., Акишев А.Г., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Патент № 2525710 РФ МПК С12Q 1/68 (2006.01). 2014.
12. Евдокимов А.А., Нетесова Н.А., Сметанникова Н.А., Абдурашитов М.А., Акишев А.Г., Давидович Е.С., Ермолаев Ю.Д., Карпов А.Б., Сазонов А.Э., Тахауов Р.М. и др. // *Вопросы онкологии.* 2016. Т. 62. С. 117–121.
13. Evdokimov A.A., Netesova N.A., Smetannikova N.A., Abdurashitov M.A., Akishev A.G., Malyshev B.S., Davidovich E.S., Fedotov V.V., Kuznetsov V.V., Ermolaev Yu.D., et al. // *Biol. Med. (Aligarh).* 2016. V. 8. P. 342.
14. Смит К., Клко С., Кантор Ч. *Анализ генома. Методы.* / Под ред. К. Дейвиса. М.: Мир, 1990. 244 с.
15. Pepe M.S. *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction.* Oxford: Oxford University Press, 2003. 320 с.
16. Sepulveda J.L., Gutierrez-Pajares J.L., Luna A., Yao Y., Tobias J.W., Thomas S. Woo Y., Giorgi F., Komissarova E.V., et al // *Mod. Pathol.* 2016. V. 29. № 2. P. 182–193.
17. Lim B., Kim J.H., Kim M., Kim S.Y. // *World J. Gastroenterol.* 2016. V. 22. № 3. P. 1190–1201.
18. Yuasa Y., Nagasaki H., Akiyama Y., Hashimoto Y., Takizawa T., Kojima K., Kawano T., Sugihara K., Imai K., Nakachi K. // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 124. № 11. P. 2677–2682.
19. Caldeira J., Simoes-Correia J., Paredes J., Pinto M.T., Sousa S., Corso G., Marrelli D., Roviello F., Pereira P.S., Weil D., et al. // *Gut.* 2012. V. 61. № 8. P. 1115–1123.
20. Akiyama Y., Watkins N., Suzuki H., Jair K.W., van Engeland M., Esteller M., Sakai H., Ren C.Y., Yuasa Y., Herman J.G., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 23. P. 8429–8439.
21. Ooki A., Yamashita K., Kikuchi S., Sakuramoto S., Katada N., Kokubo K., Kobayashi H., Kim M.S., Sidransky D., Watanabe M. // *Oncogene.* 2010. V. 29. P. 3263–3275.
22. Kim M., Kim J.H., Jang H.R., Kim H.M., Lee C.W., Noh S.M., Song K.S., Cho J.S., Jeong H.Y., Hahn Y., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 7147–7155.
23. Yu J., Cheng Y.Y., Tao Q., Cheung K.F., Lam C.N., Geng H., Tian L.W., Wong Y.P., Tong J.H., Ying J.M., et al. // *Gastroenterology.* 2009. V. 136. № 2. P. 640–651.
24. Wang H., Zheng Y., Lai J., Luo Q., Ke H., Chen Q. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 12. e0168635.
25. Oishi Y., Watanabe Y., Yoshida Y., Sato Y., Hiraishi T., Oikawa R., Maehata T., Suzuki H., Toyota M., Niwa H., et al. // *Tumour Biol.* 2012. V. 33. № 2. P. 383–393.
26. Yang Z., Li D.M., Xie Q., Dai D.Q. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2015. V. 141. № 2. P. 211–220.
27. Jee C.D., Kim M.A., Jung E.J., Kim J., Kim W.H. // *Eur. J. Cancer.* 2009. V. 45. № 7. P. 1282–1293.
28. Yu J., Liang Q.Y., Wang J., Cheng Y., Wang S., Poon T.C., Go M.Y., Tao Q., Chang Z., Sung J.J. // *Oncogene.* 2013. V. 32. № 3. P. 307–317.
29. Wang S., Cheng Y., Du W., Lu L., Zhou L., Wang H., Kang W., Li X., Tao Q., Sung J.J., et al. // *Gut.* 2013. V. 62. № 6. P. 833–841.
30. Qu Y., Dang S., Hou P. // *Clin. Chim. Acta.* 2013. V. 424. P. 53–65.
31. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. // *Молекуляр. биология.* 2008. Т. 42. № 1. С. 12–23.