

Визначення статусу метилювання генів *LRRС3В*, *RASSF1A*, *APC* на позаклітинній ДНК та ДНК пухлини хворих із нирково-клітинним раком

І.Я. Скрипкіна¹, К.В. Онищенко¹, О.М. Кашпарова¹, В.М. Григоренко², Л.В. Перета², А.П. Онищук³, М.В. Вікарчук², О.О. Банас²

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ

²ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

³Волинська обласна клінічна лікарня, м. Луцьк

За останні 100 років за рівнем захворюваності та смертності в світі онкопатологія перемістилася з десятого місця на друге, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи. За даними ВООЗ щороку на онкозахворювання страждають 10 млн людей, а смертність від раку до 2030 року зростає на 45%, порівняно з рівнем 2007 року.

Нирково-клітинний рак (НКТ) становить до 3% усіх злоякісних новоутворень. Щорічно в світі реєструється 189,1 тис. нових випадків цієї патології і ця цифра продовжує зростати, в той час як результати лікування мають лише незначну тенденцію до поліпшення. Тому дуже важливою є діагностика пухлини на ранніх стадіях.

Етіологію злоякісних новоутворень пов'язують з різноманітними молекулярно-генетичними порушеннями, які запускають патологічний процес. Разом із тим, молекулярно-генетичні зміни можуть бути факторами прогнозу злоякісного новоутворення [1]. Одним із таких онкологічних маркерів є визначення метилювання CpG-острівців на позаклітинній ДНК у сироватці або плазмі хворих.

Основним методом верифікації НКТ є патогістологічний аналіз, при якому у 85–90% хворих діагностують світлоклітинну форму захворювання [2]. Розвиток саме цієї форми НКТ пов'язаний з багатьма генами-супресорами пухлини, локалізованими на короткому плечі 3-ї хромосоми людини. Вони можуть бути інактивовані в результаті мутацій, протяжних алейних делецій та метилювання CpG-острівців в промоторних частинах ДНК [3].

Дані про присутність позаклітинних дезоксирибонуклеїнових кислот (пкДНК) в плазмі чи сироватці крові здорових і хворих людей відомі протягом кількох десятиліть [4]. Оскільки у здорової людини пакДНК вивільняється лише під час апоптозу, то її концентрація зростає лише з віком [5]. У хворих зі злоякісною патологією, крім цієї причини, вивільнення пакДНК відбувається через некроз [2, 6, 7]. Можливість використання пакДНК як потенційного діагностичного маркера пухлин була підтверджена в подальшому багатьма дослідженнями [2, 8, 9]. Розуміння причин молекулярно-генетичних порушень може дати можливість визначення генетичних та епігенетичних факторів ризику розвитку пухлин нирки, що може слугувати додатковим маркером для діагностики та вибору раціональної тактики лікування індивідуально у кожного хворого із НКТ.

Для перевірки відповідності метилювання CpG-острівців на пакДНК плазми крові та геномній ДНК (гДНК) пухлин хворих на НКТ було обрано гени-супресори пухлин *LRRС3В*, *RASSF1A* та *APC*.

Дослідження епігенетичних порушень генів 3-ї хромосоми, за допомогою методики NotI-мікрочіпів, які виникають у злоякісних пухлинах, показали гіперметилювання (56,5%)

гена *LRRС3В* (leucine-rich repeat containing 3B) у пухлинах хворих на НКТ [10–12]. Пошук потенційних маркерів неінвазивної діагностики пухлин на пакДНК плазми крові виявив метилювання гена *LRRС3В* у 33,3% хворих на рак нирки та у 14,3% – на рак товстої кишки [13].

Наступний ген, обраний як ще один потенційний маркер пухлин, *RASSF1A* (Ras association domain family 1A), картований на ділянці хромосоми людини 3p21.3. Він відомий як один з ключових генів патогенезу карцином. Гіперметилювання цього гена відзначено у багатьох пухлинах епітеліального походження, зокрема у хворих на НКТ, меланому шкіри, рак легенів та грудної залози [5, 9, 14–16]. Також було показано метилювання *RASSF1A* на пакДНК у сироватці та сечі хворих на НКТ – 46% та 17% відповідно [9].

Ген *RASSF1* має два різні промотори, що призводять до утворення основних транскриптів, – *RASSF1A* та *RASSF1C* і двох незалежних CpG-острівців в районі цих промоторів. Другий CpG-острівець знаходиться в межах першого екзону з відкритої рамки зчитування у транскрипті *RASSF1A*. Метилювання обох цих ділянок ДНК вимикає транскрипцію *RASSF1A*, тому дослідники у своїх роботах розглядають саме гіперметилювання цього транскрипту. Проте визначення метилювання якого саме з CpG-острівців відбулося при розвитку злоякісного новоутворення є важливим для вивчення канцерогенезу пухлини та виявлення ген-специфічних маркерів. Так, Спагнарді і співавтори виявили, що ці острівці по-різному метилюються у клітинних лініях меланом та зразках пухлин хворих на рак шкіри [17]. При цьому метилювання ділянки 2 було визначено у більшій кількості зразків. Серед 41 хворого з меланомою шкіри одночасне метилювання двох ділянок виявили у 16 (39%).

Ген *APC* (adenomatous polyposis coli) розташований на ділянці хромосоми людини 5p21-5p22. Даний ген кодує білок аденоматозного поліпозу кишечника, що є супресором пухлинного росту. *APC* бере участь у Wnt-сигнальному шляху в якості негативного регулятора, тому втрата його функції сприяє прогресії раку, зокрема розвитку сімейного аденоматозного поліпозу (САП, або FAP). *APC* також відіграє важливу роль у клітинній міграції, адгезії, хромосомній сегрегації, збірці веретена, апоптозі і диференціації нейронів. Мутації в ньому призводять до ініціації та розвитку раку товстої кишки та деяких інших видів раку, в тому числі раку нирок. Під час онкогенезу цей ген характеризується підвищеним метилюванням [18]. У дослідженні І.Я. Скрипкіної та співавторів виявлено метилювання CpG-острівців даного гена у 33,3% пакДНК плазми крові хворих із НКТ [13]. Метилювання гена *APC* у хворих на світлоклітинний та папілярний рак нирки спостерігалось в 19–23% [20]. За результатами досліджень Мотоями і співавторів, наявне гіперметилюван-

ня CpG-острівців у промоторних ділянках гена *APC* також у хворих на рак товстої кишки та рак шлунка. А у жінок, хворих на рак грудної залози, гіперметиловання промоторного CpG-острівця цього гена було виявлено у 76% випадках, і в жодному разі серед 21 зразка в здоровій тканині [19].

Мета дослідження: визначення метиловання генів-супресорів пухлин *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC* для порівняння їхнього статусу на гДНК пухлини та пкДНК в плазмі крові у хворих на світлоклітинну форму НКР.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженнях використано біологічний матеріал 21 хворого, прооперованого з приводу НКР в «Інституті урології НАМН України» в період 2013–2014 рр.: плазма крові до та після операції (через 3–5 днів), тканина пухлини нирки і прилеглої паренхіми, а також 15 зразків плазми крові здорових донорів, надані за їхньої згоди.

У дослідження включено 9 (43%) жінок та 12 (57%) чоловіків. Хворі до оперативного втручання були обстежені в повному обсязі, згідно з протоколами Міністерства охорони здоров'я України: лабораторно-клінічні аналізи, променеві методи дослідження (ультразвукова діагностика з доплерографією, реносцинтиграфія, спіральна комп'ютерна/магнітно-резонансна томографія органів заочеревинного простору).

За стадіями хворі розподілилися таким чином: I стадія встановлена у 12 (57,1%) хворих, II – у 7 (33,3%), III – у 1 (4,8%), IV – у 1 (4,8%). Органозберігальне лікування проведено у 17 (80,9%) хворих, нефректомія – у 4 (19,1%). Після патогістологічного заключення у всіх хворих був діагностований світлоклітинний НКР. Ступінь злоякісності за Фурманом: I – виявлено у 16 (76,2%) хворих, II – у 3 (14,3%), III – 1 (4,8%) та IV – у 1 (4,8%).

Зразки умовно здорової паренхіми та пухлини нирки до використання зберігали за температури -70 °C. Зразки крові транспортувались на льоду за температури +4 °C та зберігались до отримання з них плазми не більше 4 год.

Забір крові проводили в пластикові пробірки об'ємом 5 мл, що містили етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА) в якості антикоагулянта в концентрації 1,5 мг сухого реагенту на 1 мл крові. Кров відстоювали протягом 2–4 год за температури +4 °C, ретельно відбирали вільну від еритроцитів фракцію крові, переносили у нові центрифужні пробірки і поетапно центрифугували за температури +4 °C, кожен раз переносючи супернатант у нову центрифужну пробірку: 1500 об/хв протягом 7 хв, 1800 об/хв – 8 хв, 2200 об/хв – 10 хв. Таким чином з 10 мл крові отримували від 2 до 4,5 мл плазми у здорових донорів і 3,5–5,5 мл – у хворих. Плазму фасували у пробірки по 200 мл і зберігали за температури -70 °C. Отриману плазму використовували для виділення пкДНК крові.

Виділення пкДНК з плазми крові проводили за допомогою набору реактивів фірми «BioSilica» «Набір для виділення ДНК з плазми крові 100х», (Новосибірськ, Росія). Перед початком роботи прогрівали розчин для сорбції протягом 5–10 хв за температури 55–56 °C до повного розчинення солей.

До 200 мкл розмороженого зразка плазми додавали два об'єми розчину для сорбції, перемішували на вортексі. Наносили на колонку з фільтром 100 мкл розчину для промивки 1 і зразок для виділення. Центрифугували 1 хв при 13 000 об/хв. Після чого наносили на фільтр 300 мкл розчину для промивки 1 і знову центрифугували 1 хв при 13 000 об/хв. Видаляли фільтрат. Наносили на фільтр колонки 500 мкл розчину для промивки 2 і центрифугували 1 хв при 13000 об/хв. Видаляли фільтрат і повторювали промивку розчином 2. Переносили пухлу пробірку з мікроколонкою у центрифугу і центрифугували 30 с при 13 000 об/хв для видалення залишків розчину. Після чого мікроколонку пе-

реміщали в нову пробірку на 1,5 мл. Наносили на фільтр 50 мкл дистильованої води для елюції пкДНК і інкубували за кімнатної температури протягом 2 хв. Для елюції пкДНК пробірку з колонкою центрифугували 2 хв за температури 13 000 об/хв.

Визначали концентрацію виділеної пкДНК за допомогою спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США). Отримані зразки зберігали до використання при -20 °C.

Виділення гДНК зі зразків пухлин та прилеглих тканин хворих з раком нирок проводили за допомогою набору «Gen Elute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit» («Sigma», Німеччина).

Для дослідження зважували 10–25 мг досліджуваного матеріалу та поміщали у стерильні пробірки на 1,5 мл типу Еппендорф з маркуванням «вільні від ДНКаз та РНКаз». До кожного зразка додавали по 180 мкл розчину для лізису (Lysis Solution) та по 20 мкл Протеїнази К з концентрацією 20 мг/мл («Thermo Scientific», США). Усю суміш перемішували на вортексі та інкубували протягом ночі за температури +55 °C до повного лізису тканин.

Після цього до розчиненого матеріалу додавали по 200 мкл розчину для лізису С (Lysis Solution С) та перемішували на вортексі протягом 15 с. Далі суміш інкубували 10 хв за температури +70 °C. У цей час в кожну колонку з фільтром (Gen Elute Miniprep Binding Column) додавали по 500 мкл розчину для колонки (Column Preparation Solution) та центрифугували протягом 1 хв при 12 000 об/хв для врівноваження колонок.

Після завершення 10-хвилинного інкубування до досліджуваної суміші додавали по 200 мкл 96% етанолу, перемішували за допомогою вортексу до однорідності. Усю суміш з пробірок переносили в окремі підготовлені колонки з фільтрами (Gen Elute Miniprep Binding Column) та центрифугували 1 хв при 6500 об/хв. Після цього колонки з фільтрами переносили в нові підставки для колонок на 2 мл та додавали на фільтр по 500 мкл розчину для промивання (Wash Solution), центрифугували 1 хв при 6500 об/хв. Після чого робили повторне промивання з центрифугуванням 3 хв при 12 000–16000 об/хв. Кожну колонку з фільтром переносили в нову пробірку на 1,5 мл з додаванням на фільтр по 200 мкл деіонізованої води для елюції ДНК. Колонки з фільтрами інкубували за кімнатної температури протягом 5 хв і далі центрифугували 1 хв при 10 000 об/хв.

Для перевірки метиловання ДНК спочатку піддавали бісульфитному обробленню, а потім ставили метил-специфічну полімеразну ланцюгову реакцію (МС-ПЛР) у реальному часі. МС-ПЛР проводили з раніше підібраними праймерами до генів-супресорів *LRRC3B*, *RASSF1A*, *APC* у приладі для проведення ампліфікації у режимі реального часу «iCycler CFX96» («Bio-Rad», США) [13].

Для бісульфитної конверсії брали по 45 мкл пкДНК та по 500 нг геномної ДНК. Бісульфитне оброблення проводили за допомогою набору E.Z. DNA Methylation Kit (Zymo Research Corporation, США) за відповідним протоколом.

Перед початком роботи готували бісульфитну суміш: до реагенту СТ (conversion reagent) додавали 750 мкл H₂O та 210 мкл M-dilution buffer до повного розчинення реагенту СТ.

До 45 мкл розчину ДНК додавали 5 мкл М-буферу (M-dilution buffer) та інкубували 15 хв за температури +37 °C. Одразу після інкубації додавали бісульфитну суміш. Після цього проби інкубували за температури +50 °C протягом 16 год та переносили на 15 хв на льодяну баню за температури +4 °C. Після інкубації бісульфитну суміш наносили на колонки Zymo-spin IC Column, додавали 400 мкл М-буферу для зв'язування (M-Binding buffer), колонки декілька разів перевертати для рівномірного змішування, центрифугували при 10 000 g 30–60 с. Потім до колонок додавали 100 мкл буфера

ОНКОЛОГИЯ

**Результати визначення метилювання зразків ДНК, отриманих від хворих з НКР з SYBR Green I.
Пік плавлення порівнювали з позитивним контролем**

№ з/п	Вік/стать	Стадія		пкДНК								гДНК											
				До операції				Після операції				НКР				Прилегла до пухлини нирки паренхіма							
				LRRС3В	APC	RASSF1A-1	RASSF1A-2	LRRС3В	RASSF1A-1	RASSF1A-2	APC	LRRС3В	APC	RASSF1A-1		RASSF1A-2		LRRС3В	APC	RASSF1A-1		RASSF1A-2	
														мет/немет	мет/немет	мет/немет	мет/немет			мет/немет	мет/немет		
1	64/Ж	pT2aN0M0	II	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-/+	-	-	-/+	-	-/+	-	-/+			
2	51/М	pT2N0M0	II	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	-/+	-/+			
3	56/М	pT1aN0M0	I	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	-	-/+	-/+			
4	29/Ж	pT1vN0M0	I	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-/+	+/+	-	-	-	+/+	-/+	-/+			
5	50/М	pT1aN0M0	I	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-/+	+/+	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
6	57/М	pT3N1M0	IV	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+/+	-/+	-	-	-	+/+	-/+	-/+			
7	56/Ж	pT1aN0M0	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-			
8	63/М	pT1vN0M0	I	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+/+	+/+	-	+	-	+/+	-/+	-/+			
9	51/М	pT1vN0M0	I	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+/+	-/+	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
10	63/Ч	pT1vN0M0	I	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-/+	-/+			
11	60/Ж	pT1vN0M0	I	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-/+	+/+	+	-	-	-/+	-/+	-/+			
12	67/Ч	pT2vN0M0	II	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+/+	-/+	-	-	-	-/+	+/+	+/+			
13	62/Ж	pT2N0M0	II	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-/+	+/-	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
14	45/Ч	pT2vN0M0	II	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-/+	+/+	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
15	65/Ч	pT3aN0M0	III	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-/+	+/+	-	-	-	-/+	+/+	+/+			
16	73/Ж	pT1aN0M0	I	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-/+	+/+	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
17	58/Ж	pT1vN0M0	I	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+/+	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
18	61/Ж	pT1aN0M0	II	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+/+	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
19	27/Ч	pT1aN0M0	I	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+/+	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+			
20	60/Ж	pT1vN0M0	I	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
21	64/Ч	pT2vN0M0	II	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+/+	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+			

для промивання (M-Wash buffer) та центрифугували при 10000 g 30–60 с. Після цього до колонок додавали 200 мкл буфера для десульфонування (M-Desulfonation buffer). З ним колонки інкубували 20 хв за температури 30 °С, після чого колонки двічі промивали 200 мкл буфера для промивки Wash. Після промивки колонки ще раз додатково центрифугували 2 хв при максимальних обертах. Елюцію ДНК проводили за допомогою 12 мкл буфера M-Elution. Бісульфітно-оброблену ДНК зберігали за температури -20°С до використання.

МС-ПЛР у реальному часі до метильованої форми промоторної ділянки гена *LRRС3В* проводили з праймерами LM-F 5'-GGTGGCAGGAAGGTAGGC-3' та LM-R 5'-ACCAATACC TCGCCGACG-3' (149 п.н.).

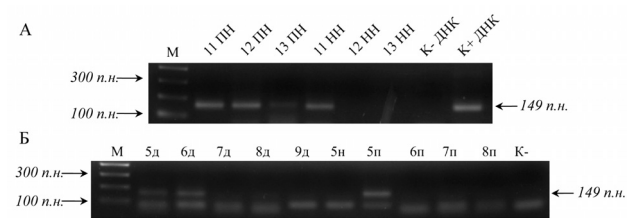
МС-ПЛР до двох промоторних ділянок гена *RASSF1* проводили, використовуючи праймери до метильованої (M) та неметилюваної (U) форм. До першого промотору (R1) використовували праймери R1M-F 5'-GTGTТАACGCG TTGCGTATC-3' і R1M-R 5'-AACCCCGCGAАСТААААААСGA-3' (93 п.н.), R1U-F 5'-TTTGTGGAGTGTGTTAATGTG-3' і R1U-R 5'-CAAACCCACAAАСТАА АААСАА-3' (105 п.н.). До другого промотору (R2) використовували праймери R2M-F 5'-TATTGCGGAGTGC GGGTC-3' та R2M-R 5'-TCGACGAACTCCCGA CGA-3' (169 п.н.) та R2U-F 5'-TATTGCGGAGTGC GGGTC-3' та R2U-R 5'-TCGA CGAАCTCCCGACG-3' (169 п.н.).

МС-ПЛР у реальному часі до метильованої форми про-

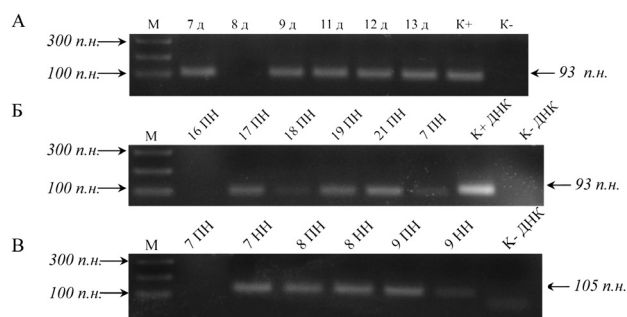
моторної ділянки гена *APC* проводили з праймерами AM-R 5'-TCG ACGAACTCCCGACG-3' і AM-F 5'-TATTGCGGAGTGC GGGTC-3' (97 п.н.).

Реакційна суміш для проведення МС-ПЛР складалась з 12,5 мкл 1 х розчину SYBR Green PCR Mix («Thermo Scientific», США), 2 мкл бісульфітно-обробленої ДНК, 5 пкмоль кожного праймеру та води, загальним об'ємом 25 мкл. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – 95°С, 15 с (в першому циклі – 10 хв); температура реасоціації праймерів – 66 °С для гена *LRRС3В*, 56°С – для гена *RASSF1*, для гена *APC* – 60 °С, 20 с; синтез – 72 °С, 20 с; 40 циклів. В якості позитивного контролю використовували ДНК, штучно метильовану за допомогою SssI-метилтрансферази («Thermo Scientific», США).

Для ідентифікації очікуваних фрагментів виконували аналіз кривих плавлення ампліфікованих з SYBR Green I продуктів та електрофорез ПЛР-продуктів у 1,5% ТАЕ-агарозному гелі при напрузі 21 В/см, використовуючи 20 мМ трис-ацетатний електрофорезний буфер у приладі для електрофорезу «Wide Mini-Sub Cell GT System» («Bio Rad Laboratories», США). Для визначення розмірів фрагментів використовували маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific», США). Аналіз кривих плавлення ПЛР-продуктів проводили за допомогою нагрівання від +55 °С до +92 °С з кроком 0,5 °С, фіксуючи флуоресценцію продуктів.



Мал. 1. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК з праймерами до гена *LRR3B*.
 А – ПЛР на ДНК пухлин нирок (ПН) та нормальних тканин нирки (НН).
 Б – ПЛР на доопераційному (д) і післяопераційному матеріалі пкДНК хворих з раком нирок та пкДНК здорових донорів (н). К+ДНК – позитивний контроль ПЛР на штучно-метильованій ДНК людини.
 К- ДНК та К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці.
 М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific», США)



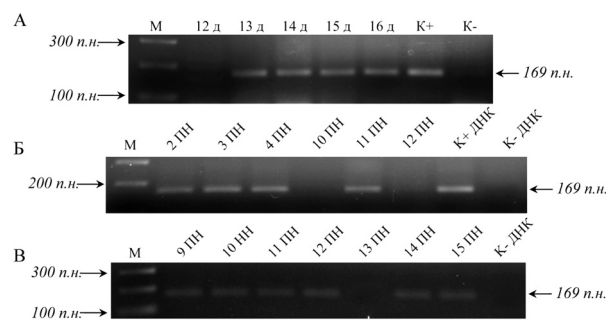
Мал. 2. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК з праймерами до метильованої (А, Б) та не метильованої (В) ділянки першого СrG-острівця гена *RASSF1A*.
 А – ПЛР на доопераційному (д) матеріалі пкДНК хворих з раком нирок; Б, В – ПЛР на ДНК зразків пухлин нирок (ПН) та нормальних тканин нирки (НН). К+ДНК – позитивний контроль ПЛР на штучно метильованій ДНК людини. К- ДНК та К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific» США)

Отримані для всіх генів продукти ПЛР як до метильованої форми ДНК, так і до неметильованої, було вибірково перевірено секвенуванням. Перевірку проводили з використанням набору для секвенування («BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit») та прямого праймера до ПЛР-продукту згідно з інструкцією виробника за допомогою автоматичного ДНК-секвенатору «Genetic Analyser 3130» («Applied Biosystems», США). Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення «Sequencing Analysis» («Applied Biosystems») та Chromas 1.55 (Technelysium LTD, Австрія). Усі нуклеотидні послідовності були отримані з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою алгоритмів ClustalW (VectorNTI 10, Invitrogen) та сервісу BLASTN (NCBI).

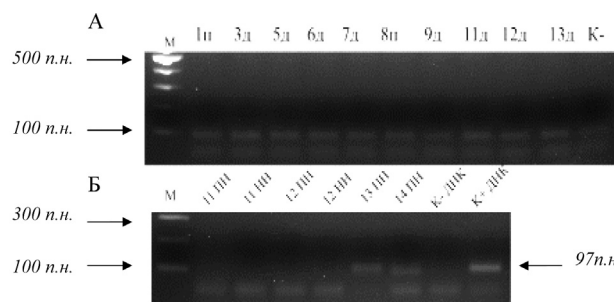
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті роботи були одержані дані з визначенням метилювання промоторів генів *LRR3B*, *RASSF1A*, *APC* (таблиця) на ДНК різного походження для 21 хворого із НКР.

Отримані результати показали метилювання гена *LRR3B* на гДНК пухлини у 11 з 20 хворих (55,0%) і у 10 з 21 (47,6%) зразка пкДНК до операції (мал.1 А). СrG-острівець гена *LRR3B* виявився метильованим на гДНК нормальної тканини у 1 з 16 обстежених хворих (6,2%). В контрольних групах пкДНК рівень метилювання виявили



Мал. 3. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК з праймерами до метильованої (А, Б) та неметильованої (В) ділянки першого СrG-острівця гена *RASSF1A*.
 А – ПЛР на доопераційному (д) матеріалі пкДНК хворих з раком нирок; Б, В – ПЛР на ДНК зразків пухлин нирок (ПН) та нормальних тканин нирки (НН). К+ДНК – позитивний контроль ПЛР на штучно метильованій ДНК людини. К- ДНК та К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix («Thermo Scientific», США)



Мал. 4. Електрофореграма продуктів МС-ПЛР зразків ДНК з праймерами до гена *APC*.
 А – ПЛР на доопераційному (д) і післяопераційному (п) матеріалі пкДНК хворих із НКР. Б – ПЛР на ДНК пухлин нирок (ПН) та нормальних тканин нирки (НН). К+ – позитивний контроль ПЛР на штучно метильованій ДНК людини. К- ДНК та К- – негативний контроль ПЛР без додавання матриці. М – маркер молекулярних мас

приблизно в однакових пропорціях: один метильований зразок на 20 (5,0%) здорових донорів та 21 (4,8%) післяопераційний забір крові обстежених хворих (мал. 1Б). У всіх пацієнтів (навіть з І стадією захворювання), у яких було виявлено метилювання промоторної ділянки гена на гДНК пухлини, було також виявлено метилювання гена і на пкДНК, що свідчить про специфічність такого тесту.

МС-ПЛР у реальному часі до першого СrG-острівця *RASSF1A* показала метилювання ДНК пухлин у 42,1% (7 з 17) хворих, ДНК нормальних тканин – 11,8% (2 з 17), пкДНК плазми крові хворих до операції – 55,0% (11 з 20) (мал. 2). У плазмі крові хворих після операції та здорових донорів метилювання першого СrG-острівця гена *RASSF1A* виявлено не було.

Метилювання другого СrG-острівця гена *RASSF1* було виявлено у 73,3% (11 з 15 пацієнтів) зразків НКР та у 60,0% (9 з 15) зразків пкДНК з плазми доопераційних хворих (мал. 3).

Кількість метильованих контрольних зразків гДНК та пкДНК для другої промоторної ділянки гена *RASSF1* виявилася меншою, ніж для першої: 20% – для гДНК прилеглої до пухлини тканини нирок, 13,3% – для пкДНК плазми крові пацієнтів після операції та 9% – на пкДНК здорових донорів. Високий відсоток метилювання другого СrG-острівця цього гена підтверджується і попередніми результатами інших дослідників, зокрема і при раку нирок [5, 8, 16].

Як видно з даних таблиці, статус метилювання для гена *APC* було виявлено у 14 із 21 зразка пкДНК (67%), виділеної з плазми хворих до операції, а також у 2 зразках пкДНК,

виділеної із плазми крові, взятої після операції. Для гДНК, виділеної із гістологічного матеріалу пухлини, статус метилювання було встановлено у 8 із 21 (38%) випадка. Тоді як для гДНК прилеглої до пухлини паренхіми – у 6,2% (1 з 16) пацієнтів. У пацієнтів після операції метилювання CpG-острівця у пкДНК плазми крові спостерігалось лише у двох пацієнтів з 21, що складає 9,5% (мал. 4).

Аналіз одночасного метилювання CpG-острівців вибраних генів-супресорів розвитку злоякісних пухлин *LRRC3B*, *APC* та *RASSF1* (таблиця) показав, що серед 11 хворих, у яких одночасно було перевірено метилювання всіх чотирьох промоторних ділянок у пухлинах і у плазмі, у 9 пацієнтів мінімум один промотор був метильований (81,8%) на гДНК пухлини і у всіх 11 – на пкДНК плазми крові.

Результати метилювання CpG-острівців на гДНК НКР 20 хворих, для яких було перевірено хоча б 2 ділянки, свідчать, що тільки в одному досліджуваному зразку не було метильовано жодного з промоторів. Для всіх інших метилювання виявили хоча б для одного з генів (95%).

Отримані результати дослідження є подібними до літературних даних.

Знижений рівень концентрації пкДНК у здорових донорів, по відношенню до онкохворих, підтверджується при визначенні концентрації за допомогою спектрофотометра NanoDrop2000 («Thermo Scientific», США), що дозволяє з високою точністю визначати концентрації ДНК у малих об'ємах (1–2 мкл розчину). Отримані в дослідженні дані свідчать про нижчий рівень пкДНК у здорових донорів (3–88 нг/мл плазми) проти хворих на рак (425–3300 нг/мл), співпадають з результатами, отриманими іншими групами дослідників [13, 21, 22]. Рівень пкДНК у плазмі крові хворих після операції істотно знижувався і перебував в межах концентрацій, властивих здоровим донорам (30–160 нг/мл плазми).

Аналіз отриманих результатів свідчить про високий рівень метилювання генів на пкДНК плазми крові та гДНК хворих із НКР. У подальших дослідженнях потрібно провести визначення метилювання інших генів-супресорів для встановлення їхнього статусу на пкДНК та на гДНК у більшій когорти хворих із НКР. У майбутньому такі результати можуть бути використані для створення тест-системи для неінвазивної діагностики злоякісних пухлин нирки.

ВИСНОВКИ

1. Результати дослідження свідчать, що концентрація пкДНК у хворих на НКР до операції знаходиться на високому рівні і значно знижується вже на 5–6-й день після усунення злоякісної пухлини хірургічним методом (або після резекції, нефректомії).

2. Метилювання генів *LRRC3B*, *RASSF1* (першого та другого CpG-острівців) та *APC* складало на пкДНК до операції 47,6%, 55,0%, 60,0% та 67% відповідно, на пкДНК після операції – 4,8%, 0%, 13,3% 9,5% у хворих на НКР.

3. Метилювання генів *LRRC3B*, *RASSF1A* (першого та другого CpG-острівців), *APC* складало на геномній ДНК пухлини 55,0%, 42,1%, 73,3%, 38% відповідно, на геномній ДНК прилеглої паренхіми – 6,2%, 11,8%, 20,0%, 5,2%, 6,2% у хворих на НКР.

4. МС-ПЛР у реальному часі до першого CpG-острівця гена *RASSF1A* з праймерами до неметилюваної ділянки показала наявність неметилюваних ділянок ДНК пухлини у 94,1% хворих та у 100% – наявність неметилюваних ділянок ДНК тканини, прилеглої до пухлини.

5. Одночасне метилювання генів *LRRC3B*, *RASSF1* (хоча б одного із CpG-острівців), *APC* на пкДНК плазми крові до операції спостерігалось у 53,3% хворих із НКР.

Сведения об авторе

Григоренко Вячеслав Николаевич – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. Юрия Коцюбинского, 9а; тел.: (044) 424-13-29

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Lujambio A. Alterations of Epigenetics and MicroRNAs in Cancer and Cancer Stem Cell. – 2008. – P. 5–7.
- Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey / M. Fleischhacker, B. Schmidt [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2007. – № 1. – P. 181–232.
- Hervouet E, Lallier L, Debien E, Chery M, Geairon A, Rogniaux H, Loussouarn D, Martin SA, Vallette FM, Cartron PF. Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS One*. 2010 Jun 29;5(6):e11333. doi: 10.1371/journal.pone.0011333.
- Leon S. Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement / 1977. – P. 45.
- Jung K. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker – A critical appraisal of the literature / K. Jung, M. Fleischhacker, A. Rabien // *Clinica Chimica Acta*. – 411. – 2010. – P. 1611–1624.
- Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation / T.E. Skvortsova, E.Y. Rykova, S.N. Tamkovich [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2006. – 94. – P. 1492–1495.
- Serum Cell-Free Dna in Renal Cell Carcinoma: a Diagnostic and Prognostic Marker / M. De Martino, T. Klatte, A. Haitel [et al.] // *Eur. Urol. Suppl.* – 2011. – 2. – P. 105.
- Transitional cell and clear cell renal carcinoma: differentiation of distinct histological types with multiphase CT / P. Bata, D.L. Tarnoki, A.D. Tarnoki [et al.] // *Acta Radiol.* – 2013. – 5. – P. 387–392.
- Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer / M.O. Hoque, S. Begum, O. Topaloglu [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – № 15. – P. 5511–5517
- Ідентифікація змін в локусах генів, які потенційно задіяні в розвитку раку нирок, за допомогою нової технології Nottl-мікрочипів / І.Я. Скрипкіна, В.І. Кашуба, В.В. Гордіюк та інші. // *Доповіді академії наук України*. – 2006. – № 11. – С. 188–192.
- Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene *LRRC3B* promoter in clear cell renal cell carcinomas / A.G. Kondratov, L.A. Stoliar, S.M. Kvasha [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2012. – № 2. – P. 509–512.
- LRRC3B* gene is frequently epigenetically inactivated in several epithelial malignancies and inhibits cell growth and replication / K. Haraldson, V.I. Kashuba, A.A. Dmitriev [et al.] // *Biochimie*. – 2012. – P. 1151–1157.
- Виявлення позаклітинної ДНК та ген-специфічного метилювання в плазмі крові пацієнтів з раком нирок та товстої кишки / І.Я. Скрипкіна, О.Г. Кондратов, Л.О. Циба [et al.] // *Наука та інновації*. – 2012. – № 6. – С. 60–66.
- Epigenetic Inactivation of RAS Association Domain Family Protein 1 (*RASSF1A*) in Malignant Cutaneous Melanoma / M. Spugnardi, S. Tommasi, R. Dammann [et al.] // *Cancer Research*. – 2003. – 63. – P. 1639–1643.
- Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients / D. S.B. Hoon, M. Spugnardi, C. Kuo [et al.] // *Oncogene*. – 2004. – 23. – P. 4014–4022.
- Methylation of the *RASSF1A* and *RARB* genes as a candidate biomarker for lung cancer. / W. Li, J. Deng, P. Jiang [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2012. – 3. – P. 1067–1071.
- Epigenetic Inactivation of RAS Association Domain Family Protein 1 (*RASSF1A*) in Malignant Cutaneous Melanoma / M. Spugnardi, S. Tommasi, R. Dammann [et al.] // *Cancer Research*. – 2003. – 63. – P. 1639–1643.
- Скрипкіна І.Я., Кондратов О.Г., Циба Л.О. та ін. Виявлення позаклітинної ДНК та ген-специфічного метилювання // *Наука та інновації*. – 2012. – P. 60–66
- Tsuchiya T., Tamura G., Sato K. and Meltzer S.J. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia // *Oncogene*. – 19. – 3642–3646.
- Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, Pinto M, Oliveira J, Lobo F, Teixeira MR, Jerônimo C. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors. *BMC Cancer*. 2007 Jul 23;7:133.
- Cell-free circulating DNA: diagnostic value in patients with testicular germ cell cancer / J. Ellinger, V. Wittkamp, P. Albers [et al.] // *J. Urol.* – 2009. – 181. – P. 363–371.
- Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: Qualitative and quantitative considerations / P. Pinzani, F. Salviani, S. Zaccara [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 2011. – 412. – P. 2141–2145.

Статья поступила в редакцию 12.05.2015