

**В. Н. Запорожан, В. В. Бубнов, В. Г. Маричереда, Н. Н. Рожковская,
Ю. Ю. Петровский, Д. Ю. Андронов**

Одесский национальный медицинский университет МЗ Украины, 65024 Одесса

УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАННОЙ ДНК ГЕНА *SFRP5* В ОПУХОЛИ КАК МАРКЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РИСКА РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В образцах ткани здоровой молочной железы, фиброаденомы молочной железы, а также аденокарциномы и неизменной ткани молочной железы, взятой от этих же больных (условно нормальная ткань), определяли содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* методом количественного пироквенирования с использованием набора *PSQ96MA* фирмы *Qiagen*. Показано, что содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах ткани здоровой молочной железы составляет $(6,0 \pm 1,3)$ %, фиброаденомы — $(10,0 \pm 1,0)$ %, условно нормальной ткани, взятой у больных раком молочной железы (РМЖ), — $(14,5 \pm 1,0)$ % и в ткани аденокарциномы — $(36,0 \pm 2,2)$ %. Чувствительность и специфичность метода пироквенирования в оценке содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* при РМЖ, просчитанная с использованием *ROC*-кривой, составили 83 % и 99 %, соответственно. Содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* в опухолевой ткани выше 20 % может служить прогностическим критерием необходимости постоянного наблюдения за пациентами с предраковыми заболеваниями молочной железы.

Ключевые слова: метилирование ДНК, ген *SFRP5*, *CG*-сайт, аденокарцинома молочной железы.

Изучение эпигенетических механизмов регуляции эмбрионального развития, роста и старения, а также нарушения этих механизмов, приводящих к возникновению различных заболеваний (в том числе и онкологических), имеет большое значение в понимании механизмов онкогенеза. Метилирование ДНК может служить диагностическим и прогностическим маркером для клинического применения [1]. Определенные гены могут быть метилированы при разных локализациях опухоли, тогда как метилирование других генов может быть специфично. Одна из групп генов, которые метилированы при раке молочной железы (РМЖ), это гены семейства *SFRP*. Они являются ингибиторами *Wnt*-регуляторного каскада. Эпигенетичес-

кая инактивация этих генов приводит к активации опухолевого роста в эксперименте. Ген *SFRP5*, взятый нами для оценки возможности использования его как диагностического маркера риска развития РМЖ, относится к этой группе генов супрессов *Wnt*-пути. Изучение метилирования гена *SFRP5* в оценке прогноза выживаемости при РМЖ показало, что наличие в опухоли метилированной ДНК промотора гена *SFRP5* было связано с низкой выживаемостью пациентов [3]. В работах [2, 4, 5] также было выявлено метилирование промотора гена *SFRP5* в 75 % случаев у больных РМЖ. В перечисленных выше работах изучение метилирования проводилось метилспецифической ПЦР, которая не дает возможности определять количественное

В. Н. Запорожан — вице-президент НАМН Украины, ректор, акад. НАМН Украины
В. В. Бубнов — зав. лаборатории молекулярной генетики, к.м.н. (bubnov@ukr.net)

Кафедра акушерства и гинекологии № 1

В. Г. Маричереда — профессор кафедры, д.м.н., профессор
Н. Н. Рожковская — профессор кафедры, д.м.н., профессор
Ю. Ю. Петровский — ассистент, к.м.н.

Д. Ю. Андронов — доцент кафедры общей и клинической фармакологии, к.м.н.

© В. Н. Запорожан, В. В. Бубнов, В. Г. Маричереда, Н. Н. Рожковская, Ю. Ю. Петровский, Д. Ю. Андронов, 2014.

нию с РМЖ лежит в области 15-19 %. Таким образом, в группе относительного риска, в которую мы включили три группы (норма + фиброаденома+ условно нормальная ткань от больных РМЖ), уровень метилированной ДНК гена *SFRP5* в ткани находится с пределах 0-19 %. При расчете риска развития РМЖ по индексу относительного риска (ОР) было показано, что при содержании метилированной ДНК гена *SFRP5* в образце ткани 10 % ОР = 1,1 (95 % доверительный интервал = 0,9-1,3; $P = 0,13$), тогда как при содержании метилированной ДНК гена *SFRP5* в образце ткани 20 % — ОР = 21 (95 % доверительный интервал = 3,1-143,1; $P = 0,002$).

Оценка чувствительности и специфичности количественного определения содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* при РМЖ методом пиросеквенирования (по ROC-кривой) составила 83 % и 99 %, соответственно.

Таким образом, определение содержания метилированной ДНК гена *SFRP5* в образцах нормальной ткани и ткани с доброкачественными и предраковыми заболеваниями может служить диагностическим и прогностическим маркером для ранней диагностики и оценки риска малигнизации доброкачественных процессов в молочной железе. Содержание метилированной ДНК гена *SFRP5* в опухолевой ткани выше 20 % может служить прогностическим критерием необходимости постоянного наблюдения за пациентами с предраковыми заболеваниями молочной железы. Метод пиросеквенирования, предложенный нами для анализа метилирования первого экзона гена *SFRP5*, является быстрым, надежным и высокоспецифичным, что дает возможность количественно определять содержание метилированной ДНК в образцах ткани молочной железы.

Список использованной литературы

1. Botla S. K., Gholami A. M., Malekpour M. et al. Diagnostic values of GHSR DNA methylation pattern in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2012. — **135**, № 3. — P. 705-713.
2. Ho C. M., Lai H. C., Huang S. H. et al. Promoter methylation of *sFRP5* in patients with ovarian clear cell adenocarcinoma // *Eur. J. Clin. Invest.* — 2010. — **40**, № 4. — P. 310-318.
3. Suzuki H., Toyota M., Carraway H. et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer // *Br. J. Cancer.* — 2008. — **98**, № 6. — P. 1147-1156.
4. Veeck J., Geisler C., Noetzel E. et al. Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (*SFRP5*) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis // *Carcinogenesis.* — 2008. — **29**, № 5. — P. 991-998.
5. Verschuur-Maes A. H., de Bruin P. C., van Diest P. J. Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2012. — **136**, № 3. — P. 705-715.

Получено 25.06.2014

РІВЕНЬ МЕТИЛОВАНОЇ ДНК ГЕНА *SFRP5* У ПУХЛИНІ ЯК МАРКЕР ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ І ПРОГНОЗУВАННЯ РИЗИКУ РОЗВИТКУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

В. М. Запорожан, В. В. Бубнов, В. Г. Маричереда, Н. М. Рожковська,
Ю. Ю. Петровський, Д. Ю. Андронов

Одеський національний медичний університет МОЗ України, 65024 Одеса

У зразках тканини здорової молочної залози, фіброаденоми молочної залози, а також аденокарциноми та незмінної тканини молочної залози, узятих від цих же хворих (умовно нормальна тканина), визначали рівень метильованої ДНК гена *SFRP5* методом кількісного пиросеквенування з використанням набору *PSQ96MA* фірми *Qiagen*. Показано, що рівень метильованої ДНК гена *SFRP5* у зразках тканини здорової молочної залози становив $(6,0 \pm 1,3)$ %, фіброаденоми — $(10,0 \pm 1,0)$ %, умовно нормальної тканини, узятої у хворих раком молочної залози (РМЗ), — $(14,5 \pm 1,0)$ % і у тканині аденокарциноми — $(36,0 \pm 2,2)$ %. Чутливість і специфічність методу пиросеквенування при оцінці рівня метильованої ДНК гена *SFRP5* при РМЖ, розраховані за допомогою ROC-кривої, становили 83 % і 99 %, відповідно. Вміст метильованої ДНК гена *SFRP5* у пухлинній тканині вище 20 % може бути прогностичним критерієм необхідності постійного спостереження за пацієнтами із передраковими захворюваннями молочної залози.

THE LEVEL OF METHYLATED DNA OF *SFRP5* GENE IN TUMOR AS A MARKER FOR DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF THE RISK OF DEVELOPMENT OF BREAST CANCER

**V. N. Zaporozhan V. V. Bubnov, V. G. Marichereda, N. N. Rozhkovskaia,
Yu. Yu. Petrovsky, D. Yu. Andronov**

Odessa National Medical University Ministry of Health Ukraine, 65024 Odessa

In the samples of tissue of healthy breast, breast fibroadenoma, adenocarcinoma, as well as invariable breast tissue taken from these patients (conditionally normal tissue), determined was the content of methylated DNA of *SFRP5* gene by quantitative pyrosequencing method using *PSQ96MA* set (*Qiagen Co.*). The content of methylated DNA of *SFRP5* gene in the samples of tissue of healthy breast was found to be $(6.0 \pm 1.3) \%$, fibroadenoma — $(10.0 \pm 1.0) \%$, conditionally normal tissue — $(14.5 \pm 1.0) \%$, and adenocarcinoma — $(36.0 \pm 2.2) \%$. The sensitivity and specificity of pyrosequencing method in the assessment of content of methylated DNA of *SFRP5* gene in breast cancer based on *ROC*-curve method were 83 % and 99 %, respectively. The content of methylated DNA of *SFRP5* gene in the tumor tissue above 20 % may be a prognostic criterion for the need of constant monitoring of patients with precancerous conditions of the mammary gland.