

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-90-99



Особенности метилирования CpG-сайтов некоторых генов Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с раком молочной железы до и после лечения

Т.Г. Гончарова, Н.А. Омарбаева, Д.Р. Кайдарова, М.Г. Оразгалиева, Л.А. Мальшева

Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии; Республика Казахстан, А05А2В4 Алматы, проспект Абая, 91

Контакты: Татьяна Георгиевна Гончарова goncharova.2004@mail.ru,
Назгуль Айдарбековна Омарбаева nazgulek87@mail.ru

Введение. Рост первичной заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) за последнее десятилетие и увеличение числа пациентов с диссеминированным РМЖ в Республике Казахстан обуславливают необходимость поиска возможностей ранней диагностики злокачественных новообразований. Определение маркеров РМЖ в эпигенетических исследованиях позволяет использовать их в качестве диагностических показателей наличия злокачественной опухоли и предикторов эффективности лечения пациентов с данной патологией.

Цель исследования – поиск эпигенетических терапевтических и прогностических маркеров РМЖ.

Материалы и методы. В исследование вошли образцы биологического материала (периферическая кровь) 50 условно здоровых людей и 103 больных местно-распространенным и диссеминированным РМЖ, получавших специальную терапию. Методы проведения исследования: забор крови, выделение ДНК, создание профилей метилирования ДНК, секвенирование, статистическая обработка данных.

Результаты. Результаты поиска эпигенетических мутаций в периферической крови больных РМЖ показали их роль как диагностических, терапевтических и прогностических маркеров со специфичностью 91 % и чувствительностью 94,0 %. Проверена и подтверждена гипотеза о терапевтической значимости ранее обнаруженных диагностических маркеров для пациентов с РМЖ, а именно метилирования в островках CpG, связанных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434).

Заключение. Определена корреляционная связь между особенностями метилирования ДНК и течением болезни на фоне лечения. Данные, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы в клинической практике: эпигенетические маркеры, такие как метилирование в островках CpG, связанных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), можно применять как прогностические маркеры и терапевтические предикторы при РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, эпигенетика, метилирование ДНК, биомаркер

Для цитирования: Гончарова Т.Г., Омарбаева Н.А., Кайдарова Д.Р. и др. Особенности метилирования CpG-сайтов некоторых генов Т-лимфоцитов периферической крови пациентов с раком молочной железы до и после лечения. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(2):90–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-2-90-99

The specifics of CpG islets methylation of some genes of peripheral blood T-lymphocytes in breast cancer patients before and after treatment

T.G. Goncharova, N.A. Omarbayeva, D.R. Kaidarova, M.G. Orazgaliyeva, L.A. Malysheva

Kazakh Institute of Oncology and Radiology; 91 Prospekt Abaya, Almaty A05A2B4, Republic of Kazakhstan

Contacts: Tatyana Georgievna Goncharova goncharova.2004@mail.ru,
Nazgul Aidarbekovna Omarbayeva nazgulek87@mail.ru

Introduction. The growth of primary breast tumor morbidity in the last ten years and increased number of patients with disseminated breast cancer in the Republic of Kazakhstan require the search for methods of early diagnosis of malignant tumors. Determination of breast cancer markers in epigenetic studies allows to use them as diagnostic signs of the presence of malignant tumor and as predictors of treatment effectiveness in patients with this pathology.

Aim. To perform a search for therapeutic and prognostic breast cancer markers.

Materials and methods. The study included samples of biological material (peripheral blood) of 50 deemed healthy individuals and 103 patients with locally advanced and disseminated breast cancer receiving special therapy. The following methods were used: blood collection, DNA extraction, creation of DNA methylation profiles, sequencing, statistical data analysis.

Results. The results of search for epigenetic mutations in peripheral blood of patients with breast cancer showed their role as specific diagnostic, therapeutic and prognostic markers with specificity 0.91 % and sensitivity 0.94 %. The hypothesis on therapeutic significance of identified earlier diagnostic markers in patients with breast cancer, namely hypermethylation of CpG islands associated with genes *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51* and CpG island associated with intragene part of chromosome 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434) was tested and confirmed.

Conclusion. A correlation between DNA methylation characteristics and disease progression during treatment was shown. The study results can be used in clinical practice: epigenetic markers, such as methylation in the CpG islets associated with the *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51* genes, and in the CpG islet associated with the intragenic site of chromosome 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434) can be used as prognostic markers and therapeutic predictors of breast cancer.

Keywords: breast cancer, epigenetics, DNA methylation, biomarker

For citation: Goncharova T.G., Omarbayeva N.A., Kaidarova D.R. et al. The specifics of CpG islets methylation of some genes of peripheral blood T-lymphocytes in breast cancer patients before and after treatment. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):90–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-90-99

ВВЕДЕНИЕ

Рост первичной заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) за последнее десятилетие и увеличение числа больных диссеминированным РМЖ в Республике Казахстан [1, 2] обуславливают необходимость поиска возможностей ранней диагностики злокачественных новообразований (ЗНО). Многочисленные генетические исследования пациентов с онкологическими заболеваниями опираются на использование в качестве раннего диагностического биомаркера наличия мутаций в генах.

Хотя большинство патологических процессов, связанных с опухолевыми новообразованиями в организме, обусловлены генетическими изменениями, отдельные нарушения в экспрессии генов предопределены эпигенетическими трансформациями. Эпигеном отличается динамичностью, которая проявляется в метилировании цитозин-гуаниновых островков ДНК (CG-динуклеотидов). Предполагается, что иммунологические сдвиги, происходящие в организме при ЗНО, приводят к эпигенетическим альтерациям в клетках периферической крови [3, 4]. При этом установлено, что метилирование ДНК клеток мононуклеарной фракции периферической крови имеет корреляционные различия между здоровыми людьми и пациентами с ЗНО [5, 6]. Также признано, что эпигенетические нарушения в экспрессии ключевых генов, включая *TSG*, играют большую роль в канцерогенезе в целом и в развитии РМЖ в частности [7–9]. Такое эпигенетическое изменение, как aberrантное метилирование ДНК, не предполагает изменений в последовательности ДНК и представляет собой ковалентную химическую структуру ДНК, которая оказывает большое влияние на экспрессию целого гена. Таким образом, эта видоизмененная экспрессия генов приводит ко многим накопленным трансформациям, которые могут влиять на процесс онкогенеза [10].

Предпосылкой для планирования настоящих исследований был факт обнаружения эпигенетических

маркеров, которые можно использовать в ранней диагностике ЗНО, в частности РМЖ. Стоит отметить, что определение профиля метилирования ДНК и анализ транскриптомов опухолей отражают специфический иммунный почерк в зависимости от подтипа опухоли [11–13]. Например, R. Yang и соавт. обнаружили, что при РМЖ (по сравнению с контрольной группой) уровень метилирования CpG-островков гена гиалуроноглюкозаминидазы 2 (*HYAL2*) в периферической крови значительно выше [14]. Поскольку в ткани РМЖ локус *HYAL2* еще более гиперметилирован, данные убедительно свидетельствуют о том, что метилирование *HYAL2* в лейкоцитах периферической крови может являться ранним биомаркером, не имеющим отношения к циркулирующей опухолевой ДНК. Авторы пришли к выводу, что метилирование *HYAL2* лейкоцитов в крови выступает в роли раннего предиктора РМЖ (специфичность 90 %). Изучение статуса метилирования ДНК внутри и вне островков CpG отдельных генов показало, что метилирование некоторых из них связано с риском развития РМЖ. A. Kuchiba и соавт. обнаружили, что глобальный уровень метилирования ДНК лейкоцитов периферической крови понижен по сравнению с нормой у пациентов с РМЖ и может быть потенциальным биомаркером риска развития данной патологии [15]. Кроме того, анализ данных в исследованиях S. Parashar, D. Cheishvili, N. Mahmood и др. выявил в Т-клетках ~10 000 сайтов, ассоциированных с прогрессированием РМЖ, из них 89 сайтов CpG также сильно коррелировали с прогрессированием заболевания ($p < 0,01$; $r > 0,7$; $r < -0,7$). Подавляющее большинство этих гипометилированных сайтов имеют прямое отношение к генам, белки которых участвуют в функционировании иммунной системы [16].

Накопление эпигенетических нарушений в клетках организма со злокачественной опухолью коррелирует с увеличением агрессии раковых клеток, изменением

их поведения с повышением инвазии в близлежащие ткани, диссеминацией по кровеносным и/или лимфатическим сосудам, что в конечном счете, при отсутствии лечения, может привести к смерти пациента. Поскольку иммунная система играет ключевую роль при контроле роста опухоли, различия в восприимчивости к терапии и прогрессировании заболевания должны быть связаны с различиями в молекулярном программировании иммунных клеток для инициации опухоль-специфичного иммунного ответа. Однако вопрос о том, существует ли особенность в ответе на терапевтическое воздействие в периферических иммунных клетках, которая поможет при планировании курсов химиотерапии, не рассматривался.

На основе геномного анализа с использованием периферической крови у больных РМЖ и в контрольной группе ранее нами были определены эпигенетические маркеры для выявления РМЖ. Наша гипотеза, основанная на предварительных исследованиях, заключается в том, что в иммунных клетках периферической крови при наличии РМЖ проявляются особенности профилей метилирования ДНК, и эти сигналы могут служить не только самыми ранними диагностическими биомаркерами заболевания, но и предикторами при планировании противоопухолевой терапии [17].

Цель исследования — поиск эпигенетических терапевтических и прогностических маркеров РМЖ.

Эпигенетический анализ, а именно выявление особенностей профилей метилирования ДНК у больных РМЖ, позволит лучше понять процессы, происходящие в организме как до, так и во время лечения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено корреляционное проспективное исследование без ослепления. В исследовании участвовали пациентки, которые были разделены на 2 группы. В 1-ю (основную) группу вошли образцы крови 103 больных в возрасте 27–83 лет с местно-распространенным и диссеминированным РМЖ (из них 60 — для оценки патоморфологического ответа опухоли на фоне проведенного лечения) до и после противоопухолевого лечения, во 2-ю (контрольную) — 50 образцов крови здоровых женщин такого же возраста, как и пациентки 1-й группы.

Всем больным после верификации диагноза проведена специализированная терапия по утвержденным международным протоколам лечения ЗНО в Казахском научно-исследовательском институте онкологии и радиологии.

Критерии включения: впервые выявленный местно-распространенный и диссеминированный РМЖ, пред- и постклимактерический возраст, дальнейшая специализированная противоопухолевая терапия согласно международным протоколам лечения.

Критерии исключения (для 1-й группы): любое выявленное воспалительное заболевание (бактериальная или вирусная инфекция), диабет, астма, аутоиммунное

заболевание, заболевание щитовидной железы в период обострения, которые могут изменять характеристики показателей иммунитета.

В электронную базу данных включены возраст пациенток, контактные данные, клинический диагноз, результаты обследований (визуальной диагностики), гистологическое заключение биопсийного материала, данные о фенотипе опухоли по результатам иммуногистохимического исследования, об ответе на противоопухолевое лечение, рецидиве и прогрессировании заболевания.

Основные изучаемые параметры:

- фенотипы опухоли у больных с диссеминированным и местно-распространенным РМЖ;
- профиль метилирования ДНК в Т-клетках и моноцитах периферической крови пациенток с РМЖ;
- динамика в профиле ДНК-метилирования в Т-клетках после проведенного специализированного противоопухолевого лечения;
- анализ значимости теста в прогностическом плане и выявление корреляций между экспрессией биомаркеров и клиническими особенностями течения заболевания.

Первый забор крови проводили во время первичной диагностики, второй — после окончания противоопухолевого лечения. Кровь забирали в количестве 15,0 мл с использованием вакуумной системы для забора крови в стерильные пробирки VenoSafe с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Сначала проведены выделение и криоконсервация лимфоцитов и плазмы из цельной крови с применением фикола. Верхний слой плазмы, который не содержит клеток, использовали для выделения циркулирующей ДНК, а слой лимфоцитов — для выделения геномной ДНК. Плазменную ДНК экстрагировали, используя внутренний «бесклеточный протокол» экстракции ДНК (HKG Epitherapeutics, Гонконг). Извлеченную ДНК конвертировали в бисульфит с помощью набора EZ DNA Methylation-Direct (ZymoResearch, Калифорния, США) и хранили при -20°C до начала дальнейшей обработки. Количество выделенной двухцепочечной ядерной ДНК должно было быть не менее 20 ng.

Секвенирование проводили методом метилирования ДНК с помощью Infinium Methylation Epicbeadarray на секвенаторе нового поколения IlluminaMiSeq (Illumina, Калифорния, США). Для мультиплексного секвенирования выполняли 2 цикла полимеразной цепной реакции (ПЦР). Первый шаг был нацелен на исследование 5 генов для образцов больных РМЖ (*JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51* и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), метилирование которых обнаружено в клетках РМЖ. Последовательность, включенная в праймеры для данного этапа амплификации, соответствовала бисульфит-конвертированной версии той целевой последовательности, которая служила якорем для второй ПЦР. При второй ПЦР добавляли праймер

для секвенирования, который определял индексную последовательность, служившую уникальным идентификатором для каждой пациентки. Первый цикл ПЦР-амплификации осуществляли в реакционных смесях, содержащих 2 мкл бисульфит-конвертированной ДНК и Taq ДНК-полимеразы (ThermoScientific, США), с применением набора обратных и прямых праймеров при помощи стандартной амплификации. Второй цикл ПЦР проводили для маркировки каждого ампликона определенным штрих-кодом с использованием серий прямого и обратного наборов штрих-кода HKG. Контроль качества выполняли с учетом результатов второй ПЦР.

Библиотеку, содержащую одинаковую дозу полученных ампликонов, объединяли в соответствии с их концентрациями двухцепочечной ДНК (дцДНК), определенными с помощью набора для анализа дцДНК Qubit™ HS (Invitrogen, США), после чего дважды очищали, используя очищающие шарики, и определяли количество с помощью ПЦР в реальном времени (набор для количественного анализа библиотеки NEBNext® для Illumina, NewEnglandBiolabs, США). Затем проводили секвенирование на платформе Illumina с использованием MiSeqReagent V2 Micro (Illumina, США). После секвенирования файлов FastQ определяли уровень метилирования на всех участках гена для каждой пациентки. Метилирование проведено совместно с лабораторией HKG Epitherapeutics Limited (Hong Kong Science Park Shatin, Гонконг), биоинформационный анализ – в лаборатории профессора Moshe Szyf (Канада) с использованием ChAMP пакета в R.

Для каждого гена анализ ПЦР в реальном времени выполняли в 3 повторностях с использованием определенных праймеров (табл. 1) в концентрации 0,3 мМ.

С целью парного сравнения групп для каждого биомаркера использовали *t*-критерий Стьюдента. Для того чтобы удостовериться в чувствительности

и специфичности исследуемого набора маркеров метилирования ДНК при РМЖ, в качестве сравнения использовали открытые базы данных метилирования ДНК (Illumina 450K): Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA), GSE40279, GSE61496, GSE76269 и GSE66836. Для определения функционально значимых различий в метилировании ДНК при РМЖ проводили корреляционный анализ с определением прямой и обратной связей между различиями в метилировании промотора и энхансера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В основу данного исследования легли результаты нашей предыдущей работы [17]. У больных РМЖ были изучены участки CpG, ассоциированные с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC* и *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), в которых был зафиксирован определенный уровень метилирования, показавший дифференцированную корреляцию между образцами ткани опухоли и крови у больных раком молочной железы и другими злокачественными новообразованиями, нормальными тканями и образцами крови здоровых испытуемых. Эти данные легли в основу расчетов чувствительности и специфичности методического подхода, а также сопоставлены с данными, отраженными в международных базах TCGA и GSE по метилированию ДНК [17].

Основной вопрос настоящего исследования: «Можно ли использовать исследованные метилированные гены не только как диагностические, но и как прогностические маркеры у пациентов с РМЖ после лечения?» Был проведен анализ 103 образцов плазмы крови больных РМЖ, по результатам которого рассчитаны показатели чувствительности и специфичности теста для определения РМЖ (уровень метилирования островков CpG выбранных генов) по сравнению

Таблица 1. Последовательность нуклеотидов праймеров для исследуемых генов

Table 1. The sequence of nucleotides of primers for the studied genes

Целевой ген Target gene	Последовательность нуклеотидов в праймерах The sequence of nucleotides in primers	Размер ампликона, п. н. Amplicon size, bp	Референсная последовательность Reference sequence	Размерность праймера, п. н. Tm-primers bp
<i>JAM3_Fw</i>	CAAGTGACCCCAGGATCGAG	90	NM_032801	59,82
<i>JAM3_Rv</i>	CCGCCAAGTCTCCCTGAATTT			60,61
<i>C17orf64_Fw</i>	AGAAGCAGTGGGTCAGAAGC	130	NM_181707	59,96
<i>C17orf64_Rv</i>	TTGTACCTGCTCTAGTGCC			59,68
<i>MSC_Fw</i>	AGTTACATCGCTCACCTGCG	84	NM_005098	60,46
<i>MSC_Rv</i>	TGGCCATGTCAGGTTCACTG			60,25
<i>NYAP1_Fw</i>	GGGACACCAGAGGAGGAAGA	118	NM_173564	60,25
<i>NYAP1_Rv</i>	CCTCGACCTTGTCCAACCTCC			60,04

с раком другой локализации. Так, специфичность метилирования для дифференциации РМЖ от здоровых тканей и других видов рака составила 91,0 %, чувствительность – 94,0 %. С учетом результатов, полученных при исследовании обнаруженных метилированных генов как диагностических и прогностических маркеров РМЖ (для определения наиболее чувствительных), взвешенные показатели метилирования ДНК с выявлением порогового значения были включены в ROC-анализ с вычислением площади под ROC-кривой (area under curve, AUC) для каждого из них. Статистический показатель AUC, рассчитанный согласно площади под ROC-кривой, оказался равным 0,94 (табл. 2), что подтверждает очень высокий уровень информативности предложенного метода.

Исследование было сфокусировано на различии в уровнях метилирования ДНК ранее выявленных биомаркеров (*C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP*) в плазме крови больных РМЖ до и после лечения. На рис. 1 представлены результаты исследования профилей метилирования ДНК в плазме пациенток с РМЖ и здоровых людей – тепловая карта метилирования для каждой из 5 областей биомаркеров (*C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP*). Уровень значимости метилирования для клинического проявления (дифференциальное метилирование) отражен в тепловой карте в виде оттенков красного и синего цвета: ярко-синий – отсутствие метилирования (0–25 %), от голубого до белого – недостаточный уровень метилирования (26–50 %); розовый и красный – достаточный уровень

Таблица 2. Чувствительность, точность и специфичность полигенных эпигенетических маркеров рака молочной железы

Table 2. Sensitivity, accuracy and specificity of polygenic epigenetic markers of breast cancer

Показатель Parameter	Абс. (%) Abs. (%)
Чувствительность Sensitivity	0,94 (94)
Специфичность Specificity	0,91 (91)
Точность Accuracy	0,94 (94)
AUC	0,95 (95)

метилирования (51–75 %); ярко-красный – высокий уровень метилирования (76–100 %). Согласно уровню дифференциального метилирования генов (от 0 до 100 %) для всех больных ($n = 103$), они автоматически включались в одну из 4 групп: 1-я группа – «отсутствие метилирования»; 2-я – «недостаточный уровень метилирования»; 3-я – «достаточный уровень метилирования»; 4-я – «высокий уровень метилирования» (рис. 2; табл. 3).

Согласно данным, представленным на рис. 1 и в табл. 3, до лечения у большинства пациенток (56,9 %) зафиксирован высокий уровень метилирования, который для отдельных генов, таких как *C7orf51*, *GC103* и *NYAP*, составил 82,5; 69,9 и 73,8 % соответственно.

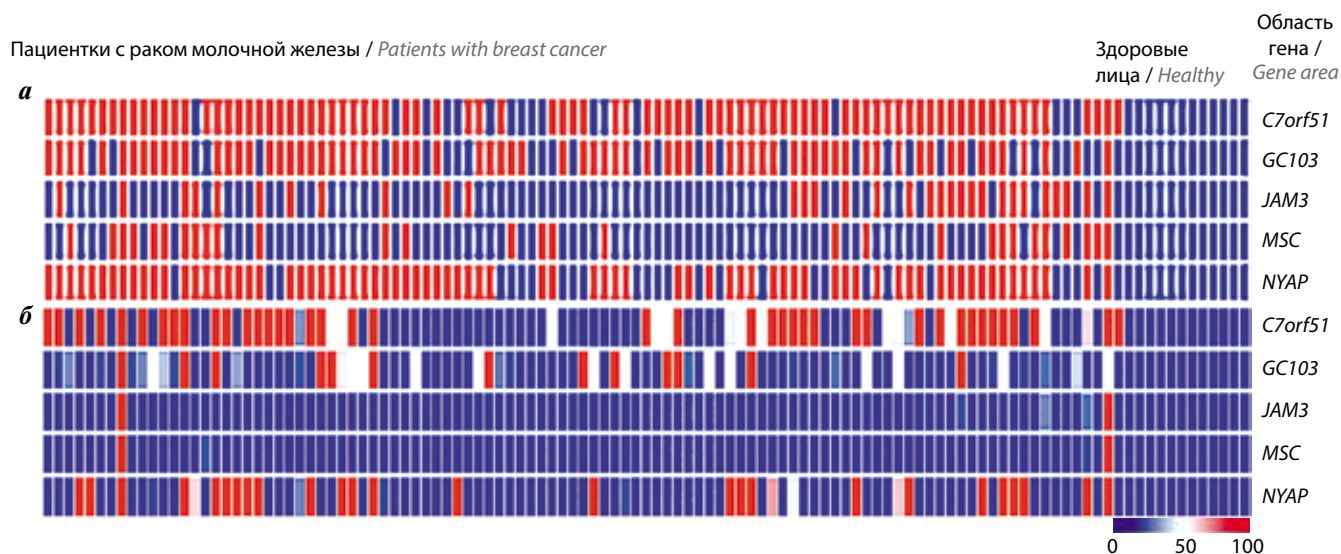


Рис. 1. Результаты исследования профилей метилирования ДНК в плазме больных раком молочной железы и здоровых людей. Тепловая карта метилирования для каждого из 5 биомаркеров. Образцы плазмы крови пациенток с раком молочной железы и здоровых людей обозначены горизонтальными полосами для отдельных участков метилирования в островках CpG, связанных с генами *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP*, для каждой пациентки: а – до лечения; б – после лечения. Уровень метилирования гена отдельных пациенток обозначен цветом: от насыщенного синего (отсутствие метилирования) к голубому, белому и насыщенному красному цвету (высокий уровень метилирования)

Fig. 1. The results of the study of DNA methylation profiles in the plasma of breast cancer patients and healthy people. A heat map of methylation for each of the 5 biomarkers. Samples of breast cancer patients and healthy people are indicated by horizontal stripes for individual methylation sites in CpG islets associated with the genes *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC*, *NYAP* for each patient: а – before treatment, б – after treatment. Individual patient gene methylation levels (according to ID) are color-coded from deep blue (no methylation) to blue, white to deep red (high methylation)

После лечения больных РМЖ суммарный уровень метилирования (по 5 целевым генам) уменьшился более чем в 3 раза, причем высокий уровень этого показателя снизился за счет перехода в 1–3-ю группы. Таким образом, у больных РМЖ после проведенного лечения метилирование в исследуемых генах отсутствовало в 74,8 % случаев. В 7,0 % случаев наблюдался «недостаточный» уровень метилирования ДНК, он оставался «достаточным» или высоким только у 1,9 и 16,3 % пациенток соответственно. При этом в отношении маркеров *JAM3* и *MSC* метилирование после лечения сохранилось только у 2 больных (см. рис. 1).

Таким образом, анализ результатов метилирования участков CpG, ассоциированных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), может быть полезным для предикативного прогнозирования ответа на лечение больных РМЖ уже на ранних этапах терапии.

- Люминальный тип А и В / Luminal types A and B
- Люминальный тип В с гиперэкспрессией Her2 / Luminal type B with Her2 overexpression
- Her2-положительный тип / Her2-positive type
- Трижды негативный тип / Triple negative type

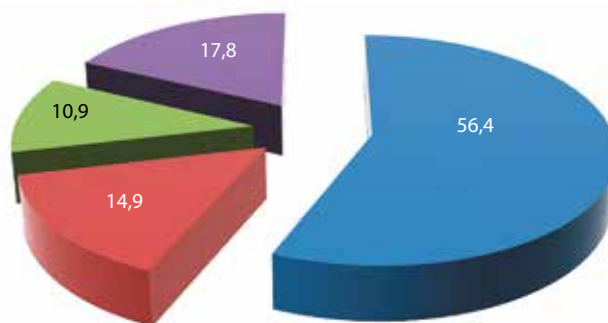


Рис. 2. Распределение больных раком молочной железы по фенотипу опухоли. Her2 – рецептор эпидермального фактора роста, тип 2
Fig. 2. Distribution of patients with breast cancer by tumor phenotype. Her2 – human epidermal growth factor receptor 2

Таблица 3. Количественный анализ образцов больных раком молочной железы (n = 103) по уровню метилирования генов (согласно данным тепловой карты) до и после лечения

Table 3. Quantitative analysis of samples of patients with breast cancer (n = 103) according to the level of gene methylation (according to heat map data) before and after treatment

Ген (биомаркер) Gene (biomarker)	Общее количество исследований, абс. (%) Total number of studies, abs. (%)	Количество образцов в группах по уровню метилирования гена, согласно данным тепловой карты, абс. (%) The number of samples in groups according to the level of gene methylation, according to the heat map data, abs. (%)			
		Отсутствие метилирования или недостаточный уровень метилирования Lack of methylation or insufficient methylation		Достаточный или высокий уровень метилирования Sufficient or high level of methylation	
		1-я группа (0–25 %) Group 1 (0–25 %)	2-я группа (26–50 %) Group 2 (26–50 %)	3-я группа (51–75 %) Group 3 (51–75 %)	4-я группа (76–100 %) Group 4 (76–100 %)
До лечения Before treatment					
<i>C7orf51</i>	103 (100)	18 (17,5)	0	0	85 (82,5)
<i>GC103</i>	103 (100)	31 (30,1)	0	0	72 (69,9)
<i>JAM3</i>	103 (100)	72 (69,9)	0	0	31 (30,1)
<i>MSC</i>	103 (100)	74 (71,8)	0	0	29 (28,2)
<i>NYAP</i>	103 (100)	27 (26,2)	0	0	76 (73,8)
<i>Всего</i> Total	515 (100)	222 (43,1)	0	0	293 (56,9)
После лечения After treatment					
<i>C7orf51</i>	103 (100)	47 (45,6)	12 (11,6)	3 (2,9)	41 (39,8)
<i>GC103</i>	103 (100)	65 (63,1)	21 (20,4)	4 (3,9)	13 (12,6)
<i>JAM3</i>	103 (100)	101 (98,1)	0	0	2 (1,9)
<i>MSC</i>	103 (100)	101 (98,1)	0	0	2 (1,9)
<i>NYAP</i>	103 (100)	71 (68,9)	3 (2,9)	3 (2,9)	26 (25,2)
<i>Всего</i> Total	515 (100)	385 (74,8)	36 (7,0)	10 (1,9)	84 (16,3)

При анализе групп РМЖ больные были распределены по возрасту, локальному статусу, фенотипу опухоли (по данным иммуногистохимического исследования), стадии заболевания, данным о рецидиве и прогрессировании заболевания, наличию метилирования ДНК.

Средний возраст пациенток с РМЖ составил $52,02 \pm 12,67$ года (27–83 года), из них к представителям азиатской национальности (южносибирская раса – казашки) относились 82,2 % больных, европеоидной расы – 17,8 %. При первом обращении в 39,6 % случаев наблюдался РМЖ ранней стадии (I–IIA стадия), в 57,5 % – местно-распространенный РМЖ (у 16,8 % больных, поступивших в стационар повторно, появились метастазы в различные органы), в 2,9 % – диссеминированный РМЖ. Узловая форма РМЖ отмечена у 87,2 % пациенток, отечно-инфильтративная – у 10,9 %, язвенная – у 1,9 %. Люминальный А и В типы встречались в 56,4 % случаев, люминальный тип В с гиперэкспрессией Her2 – в 14,9 %, трижды негативный тип – в 10,9 %, Her2-позитивный – в 17,8 % (рис. 2).

Согласно полученным данным, наиболее высокий уровень метилирования (значимый в диагностическом плане) *C7orf51* и *NYAP* у пациенток с РМЖ наблюдался до и после лечения в 39,8 и 25,2 % случаев соответственно. Этот факт, возможно, связан с наличием либо остаточной опухоли, либо метастазов или циркулирующих опухолевых клеток. С целью установления динамики в профиле ДНК-метилирования в Т-клетках после специализированного противоопухолевого лечения больных с РМЖ для оценки значимости теста в прогностическом плане и выявления возможных корреляций между метилированием в биомаркерах и особенностями клинического течения заболевания проведен анализ, результаты которого отражены на рис. 3.

Выполнен корреляционный анализ уровней метилирования в генах *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* и *NYAP* со следующими параметрами: возраст пациентов на момент постановки диагноза, стадия заболевания, фенотип опухоли и прогрессирование заболевания после лечения, результаты которого частично представлены в предыдущих исследованиях [17]. При этом на основании корреляционного анализа по методу Спирмана, определения достоверности разницы между исследуемыми параметрами с помощью критериев Краскела–Уоллиса, Пирсона и U-критерия Манна–Уитни показана лишь достоверная положительная корреляция метилирования вышеописанных генов со средним возрастом и стадией заболевания.

Данные, полученные в ходе выявления корреляций между метилированием в генах *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* и *NYAP* и прогрессированием заболевания (параметр 629, *p*-value 0,79), согласно U-критерию Манна–Уитни, отражены на рис. 3. Несмотря на выявление четкой зависимости полученных результатов

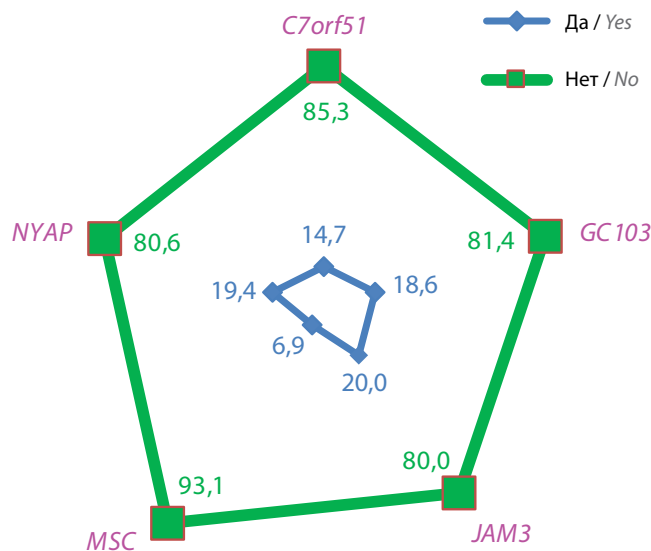


Рис. 3. Корреляции между метилированием в генах *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* и *NYAP* и наличием (да) или отсутствием (нет) прогрессирования заболевания (в процентном отношении), %
Fig. 3. Correlations between methylation in the *C7orf51*, *GC103*, *JAM3*, *MSC* and *NYAP* genes and the presence (yes) or absence (no) of disease progression (percentage), %

лечения от наличия/отсутствия метилирования в исследуемых генах у больных с РМЖ, необходимы дальнейшие исследования с увеличением размера выборки для того, чтобы дать корректное определение клинической значимости полученных корреляций.

Оценка патоморфологического ответа опухоли, индуцированного противоопухолевой терапией на фоне предоперационных курсов полихимиотерапии, и объективного ответа на лечение проведена у 60 пациенток с местно-распространенным и диссеминированным РМЖ. Полный патоморфологический ответ при проведении комбинированных курсов полихимиотерапии с таргетной терапией достигнут в 30,7 % случаев. На фоне лечения у 40 % пациенток с диссеминированным РМЖ отмечалась стабилизация процесса, у 30 % – частичная регрессия метастатических очагов, у 30 % – прогрессирование заболевания в виде увеличения размеров метастатических очагов (табл. 4).

Таким образом, прогрессирование заболевания наблюдалось у 9 больных, что составляет 15 % ($n = 60$) от общей выборки (табл. 4). Это соответствует данным корреляционного анализа между метилированием в исследуемых маркерах и показателем наличия прогрессирования опухолевого процесса (рис. 3).

Согласно нашим предварительным данным предложенный метод определения профиля метилирования ДНК в Т-лимфоцитах и мононуклеарной фракции периферической крови пациентов имеет потенциал в качестве дополнения к стандартным методам диагностики РМЖ, а также для периодического наблюдения за больными, которые проходят лечение или находятся в ремиссии после комплексной терапии.

Таблица 4. Оценка патоморфологического ответа опухоли на фоне предоперационных курсов полихимиотерапии (клинический эффект) у пациенток с метастатическим раком молочной железы

Table 4. Assessment of the pathomorphological response of the tumor against the background of preoperative polychemotherapy courses (clinical effect) in patients with metastatic breast cancer

Предоперационная ПХТ Preoperative PCT	Клинический эффект, абс. (%) Clinical effect, abs. (%)		Патоморфологический ответ, степень (%) Pathomorphological response, degree (%)
НАПХТ: NPHT: АС АС + Т/АТ D + ТТ (n = 50)	Частичная регрессия Partial regression	20 (40)	2 (10)
	Полная регрессия Full regression	13 (26)	4 (30,7)
	Стабилизация Stabilization	11 (22)	1 (9,1)
	Прогрессирование Progression	6 (12)	0
СПХТ: IPHT: АС АС + Т/АТ D + ТТ (n = 10)	Частичная регрессия Partial regression	3 (30)	–
	Полная регрессия Full regression	–	–
	Стабилизация Stabilization	4 (40)	–
	Прогрессирование Progression	3 (30)	–

Примечание. НАПХТ – неoadъювантная полихимиотерапия; СПХТ – самостоятельная полихимиотерапия; АС – антрациклины + циклофосфамид; АС + Т/АТ – антрациклины (например доксорубицин, эпирубицин с циклофосфамидом) с переходом на препараты таксанового ряда или антраклины + таксаны; D + ТТ – доцетаксел + таргетная терапия.

Note. NAPHT – neoadjuvant polychemotherapy; IPHT – independent polychemotherapy; AS – anthracyclines + cyclophosphamide; AS + T/AT – anthracyclines (for example, doxorubicin, epirubicin with cyclophosphamide) with the transition to drugs of the taxane series or anthracyclines + taxanes; D + TT – docetaxel + targeted therapy.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многими авторами установлено, что исследование эпигенома клеток периферической крови обладает огромным диагностическим и терапевтическим потенциалом и относится к малоинвазивным методам, поскольку для теста достаточно образца плазмы крови обследуемого [17–19].

Исследование эпигенетических механизмов, на первый взгляд, кажется второстепенным по сравнению с определением генетического профиля пациента. Однако стандартный генетический анализ выявляет только нуклеотидную последовательность ДНК, но если ген-супрессор опухолевого роста метилирован неверно, это нарушение вызовет сбой в работе гена. С учетом того что нарушения в экспрессии генов появляются не только в злокачественных клетках, но и в микроокружении опухоли, обуславливая прогрессирование и рецидив заболевания, эпигенетические маркеры могут быть полезными в лечении и реабилитации пациенток с РМЖ, делая возможным применение персонализированного подхода [20]. Эпигенетический анализ в данной ситуации – метод выбора, позволяющий обнаружить потенциальные нарушения в клетках. Немаловажным различием между генетическими и эпигенетическими нарушениями является то, что последние могут быть скорректированы при помощи лекарств, которые безрезультативны в терапии в случае генетических мутаций [21]. Изучение роли эпигенетических методов в диагностике и лечении

ЗНО, в частности РМЖ, позволит понять процессы, происходящие в организме при развитии опухоли, и найти эффективные подходы к ее ранней диагностике и лечению.

Патогенетическое многообразие форм РМЖ, с одной стороны, и наличие закономерности ответной реакции на лечебное воздействие, с другой, дают основание не только для признания гетерогенности ЗНО, но и для ожидания единообразного ответа на терапию. При этом знание индивидуальных молекулярных характеристик опухоли в зависимости от степени ее патоморфологического ответа на терапию может обеспечить заблаговременную оценку результативности выбранного режима лечения с долгосрочным прогнозом для отдельного больного. В перспективе возможно управление восстановлением исходной генетической программы организма под контролем тестирования эпигенетических изменений, что позволит улучшить результаты терапии ЗНО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследования метилирования ДНК в периферической крови пациентов дают возможность определения их в роли не только как диагностического, но и как прогностического биомаркера РМЖ при минимально инвазивной диагностике.

Данное исследование уникально, поскольку предоставляет возможности дальнейшего глубокого изучения эпигенетических биомаркеров для диагностики РМЖ

и последующего контроля за рецидивом ЗНО. Данные, полученные в ходе настоящего исследования, могут быть использованы в клинической практике: эпигенетические маркеры, такие как метилирование в островках CpG, связанных с генами *JAM3*, *C17orf64*, *MSC*, *C7orf51*, и в островке CpG, связанном с внутригенным участком

хромосомы 5 (chr5: 77,208,034–77,329,434), можно применять как прогностические маркеры и терапевтические предикторы при РМЖ. Это, в свою очередь, ставит перед клиницистами и исследователями вопрос о возможной устойчивости опухоли к определенным препаратам, что требует отдельного исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кайдарова Д.Р., Шатковская О.В., Абдрахманова А.Ж. и др. Эпидемиология рака молочной железы в Казахстане (2014–2018 годы). *Онкология и радиология Казахстана* 2019;54(4):4–8. Kaidarova D.R., Shatkovskaya O.V., Abdrakhmanova A.Z. et al. Breast cancer epidemiology in Kazakhstan (2014–2018). *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2019;54(4):4–8. (In Russ.).
2. Шатковская О.В., Кайдарова Д.Р., Душимова З.Д. и др. Тенденции заболеваемости, молекулярной диагностики и лечения больных раком молочной железы в Казахстане, 2014–2019 гг. *Онкология и радиология Казахстана* 2021;62(4):16–23. DOI: 10.52532/2521-6414-2021-4-62-16-23 Shatkovskaya O.V., Kaidarova D.R., Dushimova Z.D. et al. Trends in incidence, molecular diagnostics, and treatment of patients with breast cancer in Kazakhstan, 2014–2019. *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2021;62(4):16–23. DOI: 10.52532/2521-6414-2021-4-62-16-23
3. Szyf M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis. *Genome Med* 2012;30(4):26. DOI: 10.1186/gm325
4. Bjaanæs M.M., Fleischer T., Halvorsen A.R. et al. Genome-wide DNA methylation analyses in lung adenocarcinomas: association with EGFR, KRAS and TP53 mutation status, gene expression, and prognosis. *Mol Oncol* 2016;10:330–43. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.10.021
5. Swann J.B., Smyth M.J. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007;117(5):1137–46. DOI: 10.1172/JCI31405
6. Гончарова Т.Г., Кайдарова Д.Р., Кадырбаева Р.Е. и др. Разработка метода ранней диагностики рака легких на основе метилирования клеток мононуклеарной фракции крови. *Онкология и радиология Казахстана* 2020;3(57):13–20. DOI: 10.52532/2521-6414-2020-3-57-13-20 Goncharova T.G., Kaidarova D.R., Kadyrbaeva R.E. et al. Development of a method for early diagnosis of lung cancer based on methylation of blood mononuclear fraction cells. *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2020;3(57):13–20. (In Russ.). DOI: 10.52532/2521-6414-2020-3-57-13-20
7. Guerrero-Preston R., Hadar T., Ostrow K.L. et al. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep* 2014;32(2):505–12.
8. Kanwal R., Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 2012; 81(4):303–11. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x
9. Cheishvili D., Christiansen S., Stochinsky R. et al. DNA methylation controls unmethylated transcription start sites in the genome in trans. *Epigenomics* 2017;9(5):611–33. DOI: 10.2217/epi-2016-0141
10. Cheishvili D., Stefanska B., Yi C. et al. A common promoter hypomethylation signature in invasive breast, liver and prostate cancer cell lines reveals novel targets involved in cancer invasiveness. *Oncotarget* 2015;6(32):33253–68. DOI: 10.18632/oncotarget.5291
11. Midthun D.E. Early detection of lung cancer. *F1000Res* 2016;25(5): F1000 Faculty Rev-739. DOI: 10.12688/f1000research.7313.1
12. Drake R.R., Cazares L.H., Jones E.E. et al. Challenges to developing proteomic-based breast cancer diagnostics. *OMICS* 2011;15(5):251–9. DOI: 10.1089/omi.2010.0120
13. Birse C.E., Lagier R.J., FitzHugh W. et al. Blood-based lung cancer biomarkers identified through proteomic discovery in cancer tissues, cell lines and conditioned medium. *Clin Proteomics* 2015;12(1):18. DOI: 10.1186/s12014-015-9090-9
14. Yang R., Pfützte K., Zucknick M. et al. DNA methylation array analyses identified breast cancer associated HYAL2 methylation in peripheral blood. *Int J Cancer* 2015;136(8):1845–55. DOI: 10.1002/ijc.29205
15. Kuchiba A., Iwasaki M., Ono H. et al. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case–control study in Japanese women. *Br J Cancer* 2014;110(11):2765–71. DOI: 10.1038/bjc.2014.223
16. Parashar S., Cheishvili D., Mahmood N. et al. DNA methylation signatures of breast cancer in peripheral T-cells. *BMC Cancer* 2018;18(1):574. DOI: 10.1186/s12885-018-4482-7
17. Гончарова Т.Г., Кайдарова Д.Р., Омарбаева Н.А. и др. Разработка метода ранней диагностики рака молочной железы на основе эпигенетических маркеров. *Онкология и радиология Казахстана* 2020;58(4):29–35. DOI: 10.52532/2521-6414-2020-4-58-29-35 Goncharova T.G., Kaidarova D.R., Omarbayeva N.A. et al. Epigenetic markers-based breast cancer early detection method development. *Onkologiya i radiologiya Kazakhstana = Oncology and Radiology of Kazakhstan* 2020;58(4):29–35. (In Russ.). DOI: 10.52532/2521-6414-2020-4-58-29-35
18. Klotten V., Schlensog M., Magnus L. et al. Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *J Epigenetics* 2018;13(3):217–27. DOI: 10.1080/15592294.2016.1229730
19. Brennan K., Flanagan J.M. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prev Res* 2012;5(12):1345–57. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0316
20. Солопова А.Г., Блинов Д.В., Демьянов С.В. и др. Эпигенетические аспекты реабилитации онкогинекологических больных. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология* 2022;15(2):294–303. DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.141 Solopova A.G., Blinov D.V., Demyanov S.V. et al. Epigenetic aspects in rehabilitation of female cancer patients. *Farmakoeconomika. Sovremennaya farmakoeconomika i farmakoepidemiologiya = Farmakoeconomika. Modern Pharmacoeconomics and Pharmacoepidemiology* 2022;15(2): 294–303. (In Russ.). DOI: 10.17749/2070-4909/farmakoeconomika.2022.141
21. Luo Y.H., Luo L., Wampfler J.A. et al. 5-year overall survival in patients with lung cancer eligible or ineligible for screening according to US Preventive Services Task Force criteria: a prospective, observational cohort study. *Lancet Oncol* 2019;20(8):1098–108. DOI: 10.1016/S1470-2045(19) 30329-8

Благодарность. Авторы выражают благодарность David Cheishvili, Farida Vaisheva и Moshe Szyf за помощь в организации и выполнении эпигенетических исследований.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to David Cheishvili, Farida Vaisheva and Moshe Szyf for their help in organizing and performing epigenetic studies.

Вклад авторов

Т.Г. Гончарова: написание текста статьи, анализ и интерпретация результатов, научное редактирование;

Н.А. Омарбаева: сбор клинического материала и клинических данных, анализ клинического материала;

Д.Р. Кайдарова: идея, организация исследования, разработка концепции;

М.Г. Оразгалиева: сбор и обработка биологического материала, оптимизация методов исследования;

Л.А. Малышева: редактирование.

Authors' contribution

T.G. Goncharova: article writing, analysis and interpretation of the results, scientific editing;

N.A. Omarbayeva: collection of clinical material and clinical data, analysis of clinical material;

D.R. Kaidarova: idea, research organization, concept development;

M.G. Orazgaliyeva: collection and processing of biological material, optimization of research methods;

L.A. Malysheva: editing

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Г. Гончарова / T.G. Goncharova: <https://orcid.org/0000-0003-2524-8750>

Н.А. Омарбаева / N.A. Omarbayeva: <https://orcid.org/0000-0003-0986-1328>

Д.Р. Кайдарова / D.R. Kaidarova: <https://orcid.org/0000-0002-0969-5983>

М.Г. Оразгалиева / M.G. Orazgaliyeva: <https://orcid.org/0000-0001-8191-2068>

Л.А. Малышева / L.A. Malysheva: <https://orcid.org/0000-0003-4599-4048>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки Республики Казахстан AP05131940 «Возможности определения маркеров Т-лимфоцитов в ранней диагностике и прогнозировании рака легких и молочной железы», а также в рамках бюджетной темы Министерства здравоохранения Республики Казахстан OR12165486 «Национальная программа внедрения персонализированной и превентивной медицины в Республике Казахстан».

Funding. The work was performed with the financial support of the grant Ministry of Education and Science of Republic of Kazakhstan of AP05131940 "Possibilities to determine T-lymphocyte markers in early diagnostics and prognosis of lung and breast cancer", and the work was carried out within the framework of the budget topic of Ministry of Health of Republic of Kazakhstan OR12165486 "National program for the implementation of personalized and preventive medicine in the Republic of Kazakhstan".

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальными этическими комитетами Республики Казахстан АО «Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии» (протокол № 13/17 от 28.09.2017) и НАО «Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова» (протокол № 12 (118) от 28.09.2021).

Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the local ethical committees of Republic of Kazakhstan: of Kazakh Research Institute of Oncology and Radiology (protocol No. 13/17, 28.09.2017) and Asfendiyarov Kazakh National Medical University (protocol No. 12 (118), 28.09.2021).

All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 11.02.2023. **Принята к публикации:** 12.03.2023.

Article submitted: 11.02.2023. **Accepted for publication:** 12.03.2023.