

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ *HOXA9*, *MARCH11*, *UNCX*, *PTGDR* У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

М. В. Дацкевич

mary.datskevich@ya.ru;

Научный руководитель – А. Н. Щаюк, кандидат биологических наук

Рак легкого – одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний в мире. Наиболее часто (85% случаев) регистрируется немелкоклеточный рак легкого. В настоящее время известно, что важную роль в злокачественной трансформации играют эпигенетические изменения. Дифференциальное метилирование – одно из наиболее распространенных эпигенетических изменений в опухоли и может быть ранним событием в ее формировании. Целью исследования являлось определение статуса метилирования промоторных областей генов *HOXA9*, *MARCH11*, *UNCX* и *PTGDR* в опухолевой и неопухолевой ткани у пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Выявлено статистически значимое отличие относительного уровня метилирования в опухолевой и неопухолевой ткани пациентов. Кроме того, выявлено достоверно значимое отличие относительного уровня метилирования в гене *HOXA9* у курящих и некурящих пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

Ключевые слова: рак легкого; плоскоклеточный рак легкого; аденокарцинома легкого; молекулярно-генетические маркеры; эпигенетическая регуляция.

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания относятся к мультифакториальным заболеваниям, так как на их возникновение и развитие влияет взаимодействие большого числа факторов внешней среды и генетических факторов [1].

В настоящее время большое число фундаментальных исследований сфокусировано на поиске новых инновационных подходов к прогнозированию течения онкологических заболеваний и индивидуализации системной противоопухолевой терапии. Одним из самых актуальных направлений является понимание молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов, приводящих к прогрессированию и метастазированию злокачественных опухолей, что позволит открыть новые пути контроля опухолевого роста и усилить эффективность проводимого лечения [2, 3]. Успехи эпигенетики способствуют разработке методов диагностики злокачественных заболеваний на ранних стадиях. Количественная метилспецифическая ПЦР на сегодняшний день – часто используемый и хорошо зарекомендовавший себя метод обнаружения метилирования ДНК [4].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследуемую группу были включены 73 пациента с немелкоклеточным раком легкого. Средний возраст пациентов составил 62,2 года (от 39 до 92 лет), по гендерному соотношению в выборку вошли 20 женщин (27,4%) и 53 мужчины (72,6%). 37 пациентов (50,7%) имели аденокарциному, 36 (49,3%) – плоскоклеточный рак легкого. Статус курения у 4 пациентов (5,5%) неизвестен, 43 человека (58,9%) курящих и 26 (35,6%) – некурящих. Исследование было одобрено этическим комитетом, и пациенты подписали информированное согласие на участие. Для последующего выделения ДНК были использованы образцы ткани легкого и участка опухолевой ткани на этапе получения интраоперационного материала.

ДНК из ткани легкого выделяли путем гомогенизации с помощью лабораторного прибора Tissue Lyser II с последующим лизисом в буфере и инкубированием с протеиназой K и 10% раствором SDS. После этого переходили к стандартной фенол-хлороформной экстракции, осаждению и отмывке этанолом. Обработку бисульфитом осуществляли с помощью набора EpiJET Bisulfite Conversion Kit #K1461 (Thermo Fisher Scientific). Праймеры и зонды для ПЦР, специфичные для метилирования, были синтезированы в ОДО «Праймтех», Минск. Реакции амплификации проводили в системе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Для каждого из образцов ставили реакцию по изучаемым генам (*HOXA9*, *MARCH11*, *UNCX*, *PTGDR*) и по референсному гену бета-актина. Количественная метилспецифическая реакция проводилась как для образцов опухолевой ткани, так и для образцов неопухолевой ткани одного и того же пациента. Для интерпретации полученных результатов был использован относительный уровень метилирования, который определялся как отношение уровня флуоресценции изучаемого гена к уровню флуоресценции гена бета-актина.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета STATISTICA 10. В исследовании применена описательная статистика, непараметрические методы: для сравнения зависимых выборок (значения для опухолевой и неопухолевой ткани одного и того же пациента) по количественным признакам использовался стандартизированный W-критерий Вилкоксона. Для сравнения независимых выборок (пациенты с разными гистологическими типами, выборки по возрасту, полу, стадиям) использовали стандартизированный показатель критерия Манна-Уитни. За критический уровень статистической значимости принимали вероятность безошибочного прогноза, равную 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании получены положительные уровни метилирования гена *HOXA9* для 61 пациента из 73, гена *MARCH11* – для 59 пациентов, гена *PTGDR* – для 50 пациентов, гена *UNCX* – для 62 пациентов. Эти данные были использованы для дальнейшего анализа. Были проанализированы средние уровни метилирования промоторных регионов генов *MARCH11*, *HOXA9*, *PTGDR*, *UNCX*. Получены основные статистические данные анализа статуса метилирования изучаемых генов (табл.).

Описательная статистика: относительный уровень метилирования четырех отдельных маркеров в опухолевых очагах и неопухолевой ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Ген	<i>HOXA9</i>		<i>MARCH11</i>		<i>UNCX</i>		<i>PTGDR</i>	
Тип ткани	опухоль	норма	опухоль	норма	опухоль	норма	опухоль	норма
Количество образцов	61	61	59	59	62	62	50	50
Среднее	97,60	49,63	43,04	26,95	52,99	35,37	41,13	23,42
Стандартное отклонение	40,72	37,89	19,36	13,90	34,87	17,05	36,28	25,38
Медиана	107,58	44,02	48,49	30,47	46,66	35,61	37,78	13,07
Минимум	18,49	0,43	0,73	0,44	5,03	0,58	1,58	0,01
25 процентиль	71,11	27,62	27,06	17,39	22,83	23,50	19,40	8,20
75 процентиль	127,90	61,46	54,90	36,95	78,48	43,11	63,33	31,29
Максимум	167,68	273,01	82,66	59,06	172,54	82,05	139,49	99,56

Статистическая обработка полученных результатов показала достоверное отличие относительного уровня метилирования в опухолевой и неопухолевой ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого для каждого из исследованных генов. Значение стандартизованного показателя W-критерия Вилкоксона для гена *HOXA9* составило 5,46, $p=4,89 \cdot 10^{-8}$, для гена *MARCH11* – 4,69, $p=2,67 \cdot 10^{-6}$, для гена *UNCX* – 3,64, $p=2,70 \cdot 10^{-4}$, для гена *PTGDR* – 5,38, $p=7,38 \cdot 10^{-8}$.

В исследуемой выборке не было выявлено статистически значимых отличий относительного уровня метилирования изучаемых генов в зависимости от гистологического типа опухоли, стадии заболевания, возраста и пола пациентов, однако для курящих и некурящих пациентов выявлена достоверная значимость относительного уровня метилирования в гене *HOXA9*: стандартизованный показатель критерия Манна-Уитни составил 1,96 ($p=0,049$).

Согласно данным литературы известно, что метилирование промоторных участков генов *HOXA9*, *PTGDR*, *UNCX* и *MARCH11*

является специфическим для рака изменением [4]. Следовательно, полученные результаты могут использоваться в качестве дополнительного биомаркера для выявления заболевания, а также диагностики немелкоклеточного рака легкого на ранних стадиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растущее число данных об эпигенетических изменениях, особенно метилирования промотора генов, способствующих инициации и прогрессированию немелкоклеточного рака легкого, позволяет рассматривать эти изменения как дополнительный маркер развития данного заболевания.

Результаты исследования показали, что относительный уровень метилирования генов *HOXA9*, *MARCH11*, *UNCX* и *PTGDR* в среднем выше в опухолевой ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого, чем в неопухолевой. Кроме того, относительный уровень метилирования в гене *HOXA9* у курящих в среднем выше, чем у некурящих пациентов. Статистически значимых отличий относительного уровня метилирования данных генов в зависимости от гистологического типа опухоли, стадии заболевания, возраста и пола пациентов не было выявлено.

Библиографические ссылки

1. *Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D.Hanahan, R.A.Weinberg // Cell. 2011. Vol.144. P. 646–674.*
2. *Genomic profiling toward precision medicine in non-small cell lung cancer: getting beyond EGFR / A.L. Richer [et al.] // Pharmgenomics and Personalized Medicine. 2015. Vol. 8 P. 63–79.*
3. *miRNA-93-5p Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer Cells by Targeting the PTEN-Mediated PI3K/Akt Signaling Pathway / Y. Wu [et al.] // Ann Clin Lab Sci. 2021. Vol. 51, № 3. P. 310–320.*
4. *A Panel of Novel Detection and Prognostic Methylated DNA Markers in Primary Non-Small Cell Lung Cancer and Serum DNA / A.Ooki [et al.] // Clinical Cancer Research. 2017. Vol. 23, № 22. P. 7141–7152.*