

УДК: 616-006:618.19+577.21

**А.Б. АСКАНДИРОВА¹, Н.А. ОМАРБАЕВА¹, А.Ж. АБДРАХМАНОВА¹,
Т.Г. ГОНЧАРОВА¹, М.Г. ОРАЗГАЛИЕВА¹, Д.Г. ЭДІЛБАЙ¹, Р.Е. КАДЫРБАЕВА¹**

¹Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии, г. Алматы, Республика Казахстан

Роль эпигенетических исследований в диагностике и лечении рака молочной железы

Актуальность. Огромную роль в развитии злокачественных опухолей играют генетические мутации, однако не менее существенную роль в развитии рака могут играть и эпигенетические процессы. Эпигенетические изменения не передаются по наследству и не нарушают последовательность нуклеотидов в ДНК, однако могут критически изменять их доступность для транскрипционного аппарата клетки за счет химической модификации определенных хромосомных локусов и связанных с ними генов. Примерами эпигенетических изменений являются ацетилирование и метилирование гистонов или ДНК. Эпигенетическое «включение/выключение» генов лежит также в основе дифференцировки всех типов соматических клеток. А изменение специфической «эпигенетической маркировки» клетки того или иного типа приводит к де-дифференцировке или смене фенотипа (транздифференцировке) в другой тип клеток. Учитывая масштабы эпигенетической регуляции, нетрудно понять, что нарушения этого процесса могут приводить к развитию патологий, в том числе раковых заболеваний. Обзор посвящен современным подходам и методам изучения молекулярно-генетических основ развития злокачественных опухолей и эпигенетических механизмов, в частности, метилированию ДНК при РМЖ.

Цель исследования: провести обзор и анализ имеющихся молекулярно-генетических методов изучения метилирования ДНК при РМЖ.

Результаты. Метилирование ДНК является критическим механизмом эпигенетической модификации, которая участвует в программировании экспрессии генов и может способствовать развитию онкологических заболеваний, включая РМЖ. Метилирование CpG-островков ДНК-метилтрансферазами, которое, как правило, является обратимым, модифицирует транскрипционную активность ключевых генов пролиферации или факторов транскрипции, вовлеченных в подавление или стимуляцию роста клеток.

Существуют множество генов, которые могут служить в качестве биомаркеров для раннего выявления РМЖ. В частности, обнаружено гиперметилирование промоторного участка гена *DOK7*, который является одним из диагностических специфических эпигенетических маркеров РМЖ. Проанализированные нами результаты исследований показывают, что комбинированная эпигенетическая терапия приводит к синергическому противоопухолевому ответу у пациентов с РМЖ [1-9].

Заключение. В настоящее время доступны методы диагностики и лечения, направленные на aberrантное метилирование с помощью ингибиторов ДНК-метилтрансферазы, которые запускают повторную экспрессию «молчащих» генов и позволяют повысить эффективность лечения. Aberrантное метилирование, обнаруженное в промоторах генов, является признаком онкологической трансформации, который можно использовать в качестве малоинвазивного биомаркера в жидкостях организма (кровь, плазма) для раннего выявления РМЖ. Для использования в терапии в настоящее время нет уникального биомаркера, который обладал бы достаточной специфичностью и чувствительностью, поэтому для конкретного терапевтического случая следует использовать панель из нескольких генов.

Таким образом, установлено, что методы эпигенетики обладают огромным диагностическим и терапевтическим потенциалом.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, эпигенетика, метилирование ДНК, рак молочной железы (РМЖ), биомаркер.

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующее место в структуре онкологических заболеваний. По данным ВОЗ, ежегодно в мире выявляется более 1,38 млн. новых случаев РМЖ, смертность составляет около 460 тыс. случаев. В Республике Казахстан РМЖ также занимает первое место по показателям заболеваемости. В частности, в 2016 году зарегистрировано 4653 случаев РМЖ, что составило 26,1 на 100,000 населения среди обоих полов. Летальность на 1 году жизни составляет 5,4%, а 5-летняя выживаемость – 57,8% [1]. Несмотря на развитые программы скрининга и высокую информированность об РМЖ, до сих пор высока доля пациенток, поступающих с III и IV стадиями заболевания, у которых показатели выживаемости остаются крайне

низкими. Поэтому сохраняется актуальность проблемы ранней диагностики первичного рака и его рецидивов, а также подбора эффективной терапии.

В последние годы стремительно увеличивается количество работ [2-17], посвященных изучению молекулярно-биологических факторов, которые регулируют механизмы контроля клеточного деления и смерти, а также поддержанию генетической стабильности и изучению эпигенетических механизмов возникновения рака.

Эпигенетические изменения – это изменения в экспрессии генов, которые происходят, не вызывая каких-либо нарушений в последовательности ДНК. Они являются важными ключевыми факторами развития рака и прогноза заболевания, обусловленные развитием гене-

тической и фенотипической нестабильности [2]. Модификации могут происходить как на генетическом, так и на эпигенетическом уровнях. Например, выявление мутации в гене – супрессоре опухолевого роста (TSG) является признаком накопления повреждения ДНК. В отсутствие восстановления ДНК, такая клетка становится более склонной к развитию рака. Также признано [3-5], что эпигенетические нарушения в экспрессии ключевых генов, включая TSG, играют важную роль в канцерогенезе в целом и, особенно, в развитии РМЖ. С увеличением эпигенетических нарушений увеличивается и агрессия раковых клеток, изменяется их поведение (от инвазии в близлежащие ткани до диссеминации по лимфатическим и кровеносным сосудам), которое в конечном итоге приводит к смерти пациента при отсутствии лечения. Эпигенетическое изменение, такое как aberrантное метилирование ДНК, не включает изменений в последовательности ДНК, но представляет собой ковалентную химическую модификацию ДНК, которая оказывает большое влияние на экспрессию целого гена. Таким образом, эта измененная экспрессия генов приводит ко многим накопленным изменениям, прокладывая путь к онкогенезу [6]. Применение эпигенетических методов, на первый взгляд, кажется второстепенным по сравнению с определением генетического профиля пациента. Однако стандартный генетический анализ выявляет только нуклеотидную последовательность ДНК, которая может быть не нарушена, но если ген, который защищает клетку от рака, метилирован неверно, нарушение вызовет сбой в работе гена, который может «не включиться» и не выполнить свою защитную функцию. Эпигенетический анализ в данной ситуации – единственный метод выбора, позволяющий обнаружить потенциальные нарушения в клетках. Немаловажным различием между генетическими и эпигенетическими изменениями является то, что эпигенетические изменения могут быть скорректированы при помощи лекарств, которые абсолютно бессильны в случае генетических мутаций [2].

Изучение роли эпигенетических методов в диагностике и лечении рака злокачественных опухолей, в частности РМЖ, позволит понять процессы, происходящие в организме при развитии опухоли и найти эффективные подходы к ее ранней диагностике и лечению.

Цель исследования: провести обзор и анализ имеющихся молекулярно-генетических методов изучения метилирования ДНК при РМЖ.

Материалы и методы: Обзор базируется на изложении и анализе опубликованных источников по теме «использование методов метилирования ДНК для диагностики и терапии, в частности – ранней диагностики и терапии РМЖ». В качестве источников выступают фундаментальные труды ученых, статьи в научной периодике, труды конференций и симпозиумов. Поиск литературы в электронных базах данных проводился по следующим ключевым словам: «эпигенетика», «метилирование ДНК», «эпигенетика при РМЖ», «эпигенетика в диагностике рака».

Результаты и обсуждение:

Метилирование ДНК как биомаркер для раннего выявления РМЖ. В настоящее время золотым стандартом диагностики РМЖ являются гистологическая верификация, определение степени инвазии и фенотипа опухоли. Эти методы диагностики требуют наличия опухолевого материала, то есть проведения биопсии. Биомаркеры высокой чувствительности и специфичности могут

быть обнаружены в доступных тканях или жидкостях организма пациента. Поскольку изменения паттерна метилирования ДНК являются одним из самых ранних модификаций, происходящих в процессе развития рака, исследование метилирования ДНК в роли биомаркера могут быть полезны для раннего выявления РМЖ [7-8], что делает тест более объективным.

Метилирование ДНК может быть оценено различными методами, в том числе методом конверсии бисульфита. Данная методика может быть выполнена с помощью панели выбранных генов, специфичной для метилирования ПЦР в реальном времени, с применением специфических праймеров для амплификации CpG-островков [3]. Может также использоваться общегеномный подход с высокопроизводительным секвенированием с применением бисульфит-конвертированной ДНК, полученной из различных неинвазивных биологических источников, таких как цельная кровь, сыворотка и плазма [3].

На основе геномного анализа с использованием периферической крови больных РМЖ были выявлены несколько многообещающих эпигенетических маркеров для раннего выявления РМЖ. Например, Ян и соавт. обнаружили, что CpG-островки гиалуроноглюкозаминидазы 2 (HYAL2) были значительно гипометилированы в периферической крови больных РМЖ по сравнению с контрольной группой. К тому же, уровень метилирования HYAL2 в крови выступает в роли раннего предиктора РМЖ по сравнению с группой контроля, с чувствительностью 64% и специфичностью 90%. [8]. Однако, учитывая, что локус HYAL2 гиперметилирован именно в ткани РМЖ, но при этом наблюдается гипометилирование HYAL2 в крови, представляющее собой такой же риск развития РМЖ, показатель гипометилирования HYAL2 в крови может также являться ранним неинвазивным периферическим биомаркером.

Другое похожее исследование, проведенное на плазме больных РМЖ и здоровых женщин, идентифицировало статус гиперметилирования промотора члена семейства кинезинов 1A (KIF1A) при РМЖ. Исследователи пришли к выводу, что высокий уровень метилирования промотора KIF1A в плазме также может представлять собой ранний биомаркер РМЖ [3]. Кроме того, анализ метилирования ДНК у близнецов показал, что промотор док-белка 7 (DOK7) был гиперметилирован в крови больных по сравнению с их близнецами. Данное гиперметилирование было очевидным за несколько лет до постановки диагноза. Следовательно, уровень метилирования промотора DOK7 потенциально может представлять собой биомаркер для раннего выявления РМЖ [9]. Был изучен статус метилирования ДНК внутри и вне островков CpG определенного числа генов, и некоторые из них были связаны с риском развития РМЖ. В своём исследовании, Klotten и соавт. оценивали статус метилирования группы TSG (секретиремого связанного с белками SFRP1, SFRP2, SFRP5), семейства тяжелых цепей ингибитора альфа-трипсина, член 5 (ITIH5), ингибитор WNT фактор 1 (WIF1), ингибитор dickkopf WNT сигнального пути 3 (DKK3) и RASSF1A [10] в циркулирующей опухолевой ДНК. Особенно важной находкой был тот факт, что CpG-островки DKK3 и ITIH5 были неметилированными у женщин с доброкачественными патологиями молочной железы и значительно гиперметилированными у женщин с РМЖ. Исследователи выдвинули гипотезу, что промоторное

метилирование DKK3 и ITIH5 в крови может использоваться в качестве биомаркера, главным образом, у пациентов с плотной тканью молочной железы, в то время как метилирование RASSF1A CpG островков не является хорошим биомаркером, учитывая его низкую скорость выявления у здоровых женщин.

Brennan с соавт. [11] изучали статус метилирования ДНК, локализованный за пределами CpG островных кластеров ATM серин / треонинкиназы (ATM) и повторяющихся элементов длинного вкрапленного ядерного элемента 1 (LINE1) в лейкоцитах у большой группы женщин с РМЖ и без опухоли. Они наблюдали более высокое метилирование локуса ATMmvp2a в случаях РМЖ по сравнению с контрольной группой и пришли к выводу, что этот локус можно использовать в качестве биомаркера риска развития РМЖ. Они также обнаружили, что связь метилирования ATM с риском развития РМЖ была более надежной у молодых женщин, и что этот биомаркер остается стабильным в течение не менее шести лет [11].

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 РМЖ [12].

Кроме того, анализ данных выявил в Т-клетках ~ 10000 сайтов, которые коррелировали с прогрессированием РМЖ. Учеными был составлен список из 89 сайтов CG, которые сильно коррелированы ($p < 0,01$, $r > 0,7$, $r < -0,7$) с прогрессированием РМЖ. Подавляющее большинство этих гипометилированных сайтов имеют прямое отношение к генам, отвечающим за функции иммунной системы [13].

Таким образом, оценка биомаркеров опухоли может использоваться в качестве альтернативного подхода как малоинвазивный объективный метод раннего выявления РМЖ.

Лечение РМЖ с учетом регуляции метилирования. Выявление и лечение РМЖ на ранней стадии (стадии I и II) улучшают 5-летнюю выживаемость (>93%) по сравнению с поздней стадией диагностики у пациентов с метастатическим раком (стадия IV – 22%) [14]. Были идентифицированы многочисленные TSG (например, гены репарации ДНК, апоптоза, гормональных рецепторов, клеточного цикла и гены факторов транскрипции), которые дифференцированно метилированы при РМЖ и, соответственно, могут быть хорошими терапевтическими мишенями [15]. Поэтому многообещающим методом терапии является лечение РМЖ путем регуляции белков, участвующих в процессах метилирования.

Потенциальные методы лечения РМЖ включают регуляцию активности метилирования при помощи ингибиторов ДНК-метилтрансферазы (DNMT). Более низкая активность DNMT ингибирует рост опухоли за счет повышенной экспрессии генов «молчания», таких как TSG, гены альфа-рецепторов эстрогена, E-кадгерина и SFRP. Аналогичные цитидина, такие как децитабин (5-аза-2'-дезоксцитидин) и 5-азацитидин, действуют как ингибиторы DNMT и, таким образом, могут реактивировать экспрессию ключевых генов посредством истощения DNMT1 [16]. Оба этих аналога были одобрены Управлением по контролю за продуктами питания США (FDA) для лечения миелодиспластического синдрома. Эти остатки ингибитора DNMT включаются в ДНК во время S-фазы процесса репликации и устанавливают необра-

тимые связи с ферментами ДНК-метилтрансферазы, чтобы предотвратить их действие [17]. В других исследованиях [18] также сообщалось о повышении эффективности лечения РМЖ при подобном подходе. Исследования проводились *in vivo* с целью оценки действия вышеупомянутых соединений на солидные опухоли молочной железы. Однако, в дополнение к их слабой стабильности и отсутствию специфичности к раковым клеткам, эти препараты быстро инактивируются действием цитидин-деаминазы. Следовательно, эти препараты имеют серьезные ограничения для лечения запущенных солидных опухолей, включая РМЖ. Кроме того, эти агенты могут вызывать активацию панели промета-статических генов в дополнение к активации генов-супрессоров опухоли, что может привести к увеличению метастазирования. Возникает вопрос, как нацеливаться на гены-супрессоры опухоли и блокировать рост рака с помощью ДНК-деметирующих препаратов, избегая при этом активации промета-статических генов и предотвращая метастазирование рака [19].

Эти неблагоприятные характеристики привели к разработке новых ингибиторов DNMT, а именно зебуларина, SGI-110 и NPEOC-DAC, которые более селективны в отношении раковых клеток и демонстрируют более высокую устойчивость к дезаминированию. Зебуларин обладает мощным ингибирующим действием как на DNMT, так и на цитидин-деаминазу. Было показано *in vitro*, что зебуларин в сочетании с децитабином оказывает значительное ингибирующее влияние на пролиферацию клеток и образование колоний в клеточной линии РМЖ MDA-MB-231 посредством индукции экспрессии мРНК рецептора эстрогена альфа и прогестерона [20]. Также показано, что этот препарат ингибирует рост клеток опухолей молочной железы *in vivo*, вызывая некроз и апоптоз опухолевых клеток с ранним началом у трансгенных мышей, у которых развиваются опухоли молочной железы [21]. Хотя зебуларин первоначально продемонстрировал многообещающие эффекты, связанные с его высокой селективностью в отношении раковых клеток, его токсичность делает этот препарат менее привлекательным для лечения РМЖ больных.

SGI-110 представляет собой модифицированный динуклеотид, проявляющий повышенную устойчивость к цитидин-деаминазе и увеличенный период полужизни по сравнению с децитабином и 5-азацитидином [22]. Этот короткий олигонуклеотид может быть предусмотрен для обеспечения эффективной доставки нуклеотидного лекарственного средства и защиты от дезаминирования. NPEOC-DAC является метаболическим предшественником молекулы децитабина и оказывает дозозависимый репрессивный эффект на метилирование ДНК [23].

Также было показано, что анти-DNMT активностью обладают некоторые другие природные соединения, содержащие специфические молекулы, такие как антоцианины и полифенолы [24]. Кроме того, нокдаун DNMT1, достигнутый с помощью небольшой интерференционной РНК, привел к многообещающим результатам в клетках рака толстой кишки HCT116 [25].

Учитывая, что побочные эффекты ингибирования DNMT включают сопутствующую активацию как TSG, так и протоонкогенов, в некоторых исследованиях оценивалось действие комбинации аналогов цитидина с химиотерапевтическими средствами, иммунотера-

пия или нокдаун специфических генов, таких как белок 2 связывающего домена метил-СрG (MBD2) и лизин (K)-специфическая деметилаза 1B (KDM1B / LSD2) [15].

Vijayaraghavalu и соавт. отметили значительное повышение эффективности лечения доксорубицином в клетках MCF-7, MDA-MB-231 и BT-459 в сочетании с децитадином [26]. Это двойное лечение вызвало остановку фазы клеточного цикла для более чем 90% клеток и привело к восстановлению чувствительности к доксорубицину за счет усиления экспрессии протоонкогена p21, что может позволить преодолеть лекарственную устойчивость этих клеток РМЖ. В другом исследовании *Wrangle* и соавт. оценивали последовательную комбинацию 5-азацитина и иммунотерапии. Их результаты показали, что комбинированная эпигенетическая терапия с использованием ингибитора ДНК-метилтрансферазы и запрограммированной блокады пути смерти приводила к синергетическому противоопухолевому ответу также и у пациентов с немелкоклеточным раком легкого [27].

Было показано, что MBD2, с одной стороны, подавляет метилированные гены, а с другой, участвует в активации экспрессии генов, благодаря своей способности взаимодействовать с промоторами генов. Недавнее исследование показало, что лечение, сочетающее введение ингибитора метилтрансферазы (5-азацитина) и подавление экспрессии MBD2 с использованием технологии РНК-интерференции, привело к активации апоптоза и снижению роста клеток, а также к инактивации инвазивных и метастатических процессов в клетках РМЖ. Комбинация ингибирования истощения MBD2 (метилированный ДНК-связывающий белок 2) и ДНК-метилтрансфераз (DNMT) в клетках РМЖ приводит к комбинированному эффекту *in vitro* и *in vivo*, усиливая задержку роста опухоли с одной стороны, одновременно ингибируя инвазивность, вызванную 5-azaCdR с другой стороны. Комбинированное лечение истощения MBD2 и 5-azaCdR подавляет и усиливает различные генные сети, которые индуцируются только ингибированием DNMT. Эти данные указывают на потенциально новый подход к нацеливанию механизма метилирования ДНК путем комбинации ингибиторов MBD2 и DNMT [28]. Истощение MBD2 противодействовало активационному эффекту на протоонкогены в результате лечения гипометилированием. Та же самая стратегия, включающая ингибирование ДНК-метилтрансферазы и нокдаун LSD2, была также эффективной для ингибирования роста клеток в клетках РМЖ MDA-MB-231 и MCF-7. Это лечение усилило экспрессию эпигенетически замалчиваемых генов, таких как гены, кодирующие рецептор прогестерона и альфа-рецептор эстрогена [29].

Mahmood и соавт. показали, что лечение с применением SAM (универсальный донор метильной группы - S-аденозилметионина) вызывало значительное дозозависимое снижение пролиферации, инвазии, миграции, независимого от закрепления роста и усиление апоптоза *in vitro*. Эти результаты были воспроизведены *in vivo*, когда пероральное введение SAM уменьшало объем опухоли и метастазирование в модели ксенотрансплантата MDA-MB-231 с меткой зеленого флуоресцентного белка (GFP). Анализ экспрессии генов подтвердил способность SAM снижать экспрессию нескольких ключевых генов, участвующих в прогрессировании рака и метастазировании, как в клеточных линиях, так и в ксенотрансплантатах опухоли молочной железы. Результаты этого исследования представляют убедительные

доказательства для оценки терапевтического потенциала метилирующих агентов, таких как SAM, по снижению заболеваемости и смертности от РМЖ [31].

Выводы. В последнее десятилетие было установлено несколько сигнатур экспрессии генов для характеристики и подтипирования опухолей молочной железы. Однако в настоящее время метилирование считается основным «игроком», участвующим в регуляции экспрессии генов. В отличие от профилей транскрипции РНК, которые представляют собой снимки транскрипционной активности в определенное время, сигнатура метилирования ДНК представляет собой более стабильный и «продолжительный маркер» молекулярного состояния и раковой предрасположенности клетки.

Хотя были предложены многочисленные модели метастатических процессов, последние исследования показывают, что метастатическая способность опухолей молочной железы является неотъемлемой чертой генетического фона хозяина. Предполагается, что до такого метастатического процесса эпигенетические изменения происходят на ранних стадиях процесса канцерогенеза молочной железы, и, следовательно, профиль метилирования в определенной степени отражает генетический фон индивидуумов.

Все эти наблюдения подтверждают, что оценка профиля метилирования в биологических жидкостях может представлять многообещающую технологию точного определения риска у женщин, предрасположенных к РМЖ или затронутых им. Учитывая, что циркулирующая бесклеточная ДНК в плазме крови содержит специфические для опухоли мутации и паттерны метилирования ДНК, связанные с заболеванием, выявление новых биомаркеров-предшественников потенциальной предрасположенности к раку или агрессивности в такой ДНК будет огромным достижением в прогностической медицине для женщин с высоким риском развития РМЖ. Малоинвазивное тестирование, такое как скрининг эпигенетических изменений в крови, является достаточно удобной и объективной методикой. Однако, главным образом из-за ограниченного числа пораженных и подобранных контрольных образцов ДНК, включенных в исследуемые когорты, ни один конкретный биомаркер метилирования еще не был подтвержден для клинического использования. Сочетанные исследования всего эпигенома могут способствовать созданию целой группы биомаркеров РМЖ с целью улучшения диагностики и раннего выявления РМЖ у женщин.

Хотя сообщается, что применение некоторых ингибиторов DNMT повышает эффективность стандартной химиотерапии только при некоторых типах рака, весьма оправданы дальнейшие исследования действия деметилирующих агентов *in vivo* при различных солидных опухолях. При этом не стоит забывать, что под воздействием ингибиторов DNMT усиливается скорость клеточного деления и пролиферативная активность, и поэтому для повышения их эффективности противоопухолевого лечения требуется проведение повторного лечения [28]. Кроме того, такие факторы, как токсичность, отсутствие стопроцентной специфичности, низкая стабильность, а также одновременная активация протоонкогенов, затрудняют разработку новых ингибиторов. Однако комбинированное применение этих ингибиторов DNMT с другими видами лечения, такими как химиотерапевтические препараты и РНК-интерференция, дает многообещающие результаты.

Таким образом, эпигенетические методы в сочетании с более широким доступом к малоинвазивному биологическому материалу (кровь, плазма) будут иметь решающее значение для более глубокого понимания биологии РМЖ и разработки новых методов ранней диагностики и персонализированной терапии для улучшения перспектив пациентов с РМЖ.

Список использованных источников:

1. Кайдарова Д.П. Ауезова Э.Т. Чингисова Ж.К. Сейсенбаева Г.Т. Ажмагамбетова А.Е. Жылкайдарова А.Ж. Показатели онкологической службы за 2016 год (статистические показатели). – Алматы, 2017. – 89с;
2. Szyf M. DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis // *Genome Med.* – 2012. – Vol. 4. – P. 26;
3. Guerrero-Preston R, Hadar T, Ostrow KL, Soudry E, Echenique M, Ili-Gangas C, Pérez G, Perez J, Brebi-Mieville P, Deschamps J, Morales L, Bayona M, Sidransky D, Matta J. Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity // *Oncol Rep.* – 2014. – Vol. 32. – P. 505-512;
4. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer // *Clin Genet.* – 2012. – Vol. 81. – P. 303-311;
5. Cheishvili D, Christiansen S, Stochinsky R, Pepin AS, Sapozhnikov DM, Zhou R, Schmeltzer L, Dymov S, Szyf M. DNA methylation controls unmethylated transcription start sites in the genome in trans // *Epigenomics.* – 2017 May. – Vol. 9(5). – P. 611-633;
6. Santos-Rebouças CB, Pimentel MMG. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases // *Eur J Hum Genet.* – 2007. – Vol. 15. – P. 10-17;
7. Cheishvili D, Stefanska B, Yi C, Li CC, Yu P, Arakelian A, Tanvir I, Khan HA, Rabbani S, Szyf M. A common promoter hypomethylation signature in invasive breast, liver and prostate cancer cell lines reveals novel targets involved in cancer invasiveness // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6(32). – P. 33253-33268;
8. Yang R, Pfützte K, Zucknick M, Sutter C, Wappenschmidt B, Marme F, Qu B, Cuk K, Engel C, Schott S, Schneeweiss A, Brenner H, Clauss R, Plass C, Bugert P, Hoth M, Sohn C, Schmutzler R, Bartram CR, Burwinkel B. DNA methylation array analyses identified breast cancer associated *HYAL2* methylation in peripheral blood // *Int J Cancer.* – 2015. – Vol. 136. – P. 1845-1855;
9. Heyn H, Carmona FJ, Gomez A, Ferreira HJ, Bell JT, Sayols S, Ward K, Stefansson OA, Moran S, Sandoval J, Eyfjord JE, Spector TD, Esteller M. DNA methylation profiling in breast cancer discordant identical twins identifies *DOK7* as novel epigenetic biomarker // *Carcinogenesis.* – 2013. – Vol. 34. – P. 102-108;
10. Kloten V, Schlenz M, Magnus L, Heide T, Eschenbruch J, Steib F, Tator M, Rose M, Noetzel E. Epigenetic loss of putative tumor suppressor *SFRP3* correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients // *J Epigenetics.* – 2018. – Vol. 13(3). – P. 217-227;
11. Brennan K, J Flanagan M. Is There a Link Between Genome-Wide Hypomethylation in Blood and Cancer Risk? // *Cancer Prev Res.* – 2012. – Vol. 5(12). – P. 1345-1357;
12. Kuchiba A, Iwasaki M, Ono H, Kasuga Y, Yokoyama S, Onuma H, Nishimura H, Kusama R, Tsugane S, Yoshida T. Global methylation levels in peripheral blood leukocyte DNA by LUMA and breast cancer: a case-control study in Japanese women // *Br J Cancer.* – 2014 May 27. – Vol. 110(11). – P. 2765-2771;
13. Parashar S, Cheishvili D, Mahmood N, Arakelian A, Tanvir I, Khan HA, Kremer R, Mihalciou C, Szyf M, Rabbani SA. DNA methylation signatures of breast cancer in peripheral T-cells // *BMC Cancer.* – 2018 May 18. – Vol. 18(1). – P. 574;
14. Breast cancer survival rates by stage / American Cancer Society // www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-survival-by-stage. 14.11.2014;
15. Pouliot M, Labrie Y, Diorio C, Durocher F. The Role of Methylation in Breast Cancer Susceptibility and Treatment // *Anticancer Research.* – 2015. – Vol. 35. – P. 4569-4574;
16. Santi DV, Garrett CE, Barr PJ. On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs // *Cell.* – 1983. – Vol. 33. – P. 9-10;
17. Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine // *J Biol Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P. 2041-2048;
18. Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, McCormick C, Strathdee G, Lee C, Barrett S, Reade S, Jadayel D, Tang A, Bellenger K, Mackay L, Setanoians A, Schätzlein A, Twelves C, Kaye SB, Brown R. Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors // *J Clin Oncol.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4603-4609;
19. Cheishvili D, Boureau L, Szyf M. DNA demethylation and invasive cancer: implications for therapeutics // *Br J Pharmacol.* – 2015 Jun. – Vol. 172(11). – P. 2705-2715;
20. Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells // *Breast Cancer Res Treat.* – 2010. – Vol. 120. – P. 581-592;
21. Chen M, Shabashvili D, Nawab A, Yang SX, Dyer LM, Brown KD, Hollingshead M, Hunter KW, Kaye FJ, Hochwald SN, Marquez VE, Steeg P, Zajac-Kaye M. DNA methyltransferase inhibitor, zebularine, delays tumor growth and induces apoptosis in a genetically engineered mouse model of breast cancer // *Mol Cancer Ther.* – 2012. – Vol. 11. – P. 370-382;
22. Yoo CB, Jeong S, Egger G, Liang G, Phiasivongsa P, Tang C, Redkar S, Jones PA. Delivery of 5-aza-2'-deoxycytidine to cells using oligodeoxynucleotides // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 6400-6408;
23. Byun H-M, Choi SH, Laird PW, Trinh B, Siddiqui MA, Marquez VE, Yang AS. 2'-Deoxy-N4-[2-(4-nitrophenyl)ethoxycarbonyl]-5-azacytidine: A novel inhibitor of DNA methyltransferase that requires activation by human carboxylesterase 1 // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 266. – P. 238-248;
24. Subramaniam D, Thombre R, Dhar A, Anant S. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy // *Front Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 80;
25. Morita R, Hirohashi Y, Suzuki H, Takahashi A, Tamura Y, Kanaseki T, Asanuma H, Inoda S, Kondo T, Hashino S, Hasegawa T, Tokino T, Toyota M, Asaka M, Torigoe T, Sato N. DNA methyltransferase 1 is essential for initiation of the colon cancers // *Exp Mol Pathol.* – 2013. – Vol. 94. – P. 322-329;
26. Vijayaraghavalu S, Dermawan JK, Venugopalan C, Labhasetwar V. Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of p21 gene expression leading to G2/M cycle arrest // *Mol Pharm.* – 2013. – Vol. 10. – P. 337-352;
27. Wrangle J, Wang W, Koch A, Easwaran H, Mohammad HP, Pan X, Vendetti F, Vancracking W, Demeyer T, Du Z, Parsana P, Rodgers K, Yen R-W, Zahnow CA, Taube JM, Brahmer JR, Tykodi SS, Easton K, Carvajal RD, Jones PA, Laird PW, Weisenberger DJ, Tsai S, Juergens RA, Topalian SL, Rudin CM, Brock MV, Pardoll D, Baylin SB. Alterations of immuneresponse of non-small cell lung cancer with azacytidine // *Oncotarget.* – 2013. – Vol. 4. – P. 2067-2079;
28. Cheishvili D, Chik F, Li CC, Bhattacharyya B, Suderman M, Arakelian A, Hallett M, Rabbani SA, Szyf M. Synergistic effects of combined DNA methyltransferase inhibition and MBD2 depletion on breast cancer cells; MBD2 depletion blocks 5-aza-2'-deoxycytidine triggered invasiveness // *Carcinogenesis.* – 2014. – Vol. 35. – P. 2436-2446;
29. Katz TA, Vasilatos SN, Harrington E, Oesterreich S, Davidson NE, Huang Y. Inhibition of histone demethylase, LSD2 (KDM1B), attenuates DNA methylation and increases sensitivity to DNMT inhibitor-induced apoptosis in breast cancer cells // *Breast Cancer Res Treat.* – 2014. – Vol. 146. – P. 99-108;
30. Nie J, Liu L, Li X, Han W. Decitabine, a new star in epigenetic therapy: the clinical application and biological mechanism in solid tumors // *Cancer Lett.* – 2014. – Vol. 354. – P. 12-20.

31. Mahmood N, Cheishvili D, Arakelian A, Tanvir I, Khan HA, Pépin AS, Szyf M, Rabhani SA. Methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) supplementation attenuates breast

cancer growth, invasion, and metastasis in vivo; therapeutic and chemopreventive applications // *Oncotarget*. – 2017 Dec 26. – Vol. 9(4). – P. 5169-5183.

ТҰЖЫРЫМ

**А.Б. Аскандирова¹, Н.А. Омарбаева¹, А.Ж. Абдрахманова¹,
Т.Г. Гончарова¹, М.Г. Оразғалиева¹, Д.Г. Әділбай¹,
Р.Е. Кадырбаева¹**

¹«Қазақ Онкология және Радиология ғылыми-зерттеу институты» АҚ,
Алматы қ., Қазақстан Республикасы

Сүт безі қатерлі ісігін диагностикалау мен емдеудегі эпигенетикалық зерттеулердің рөлі

Өзектілігі. Қатерлі ісіктердің дамуында генетикалық мутациялардың үлкен рөл атқаратындығы әлдеқашан дәлелденген, дегенмен қазіргі таңда эпигенетикалық үрдістердің де орасан маңызы туралы ақпарат жеткілікті. Эпигенетикалық өзгерістер тұқым қуалау жолымен берілмейді және ДНҚ-да нуклеотидтердің бірізділігін бұзбайды, алайда белгілі бір хромосомалық локустың және олармен байланысты гендердің химиялық модификациясы есебінен клетканың транскрипциялық аппараты үшін олардың қолжетімділігін өзгерте алады. ДНҚ және гистондардың ацетилденуі немесе метилденуі эпигенетикалық өзгерістердің нақты мысалы болып табылады. Гендердің эпигенетикалық «қосу/өшіру» негізінде барлық соматикалық жасушалардың бөлінуі жатыр. Ал жасушаның арнайы «эпигенетикалық маркерлерін» өзгерту де – дифференцирлеу немесе мүлдем фенотиптің өзгеруіне (транс – дифференцировка) алып келеді. Эпигенетикалық реттеудің ауқымын ескере отырып, аталған үрдістің бұзылуы түрлі ақауларға, соның ішінде қатерлі ісік ауруларының дамуына алып келуі әбден мүмкін екендігін түсіну қиын емес. Осы шолу қатерлі ісік дамуының молекулалық – генетикалық негіздерін, эпигенетикалық механизмдерді, атап айтқанда сүт безі обыры кезінде ДНҚ метилденуін зерттеу кезінде қолданылатын заманауи әдістерге арналған.

Зерттеу мақсаты: Сүт безі қатерлі ісігі кезінде ДНҚ – метилденуін зерттеу үшін қолданылатын молекулалық – генетикалық әдістерге әдейі шолу және талдау жасау.

Нәтиже. ДНҚ метилденуі гендердің экспрессиясын бағдарлау арқылы онкологиялық аурулардың, соның ішінде сүт безі қатерлі ісігінің дамуына алып келетін эпигенетикалық модификацияның ең маңызды механизмі болып табылады. Қайта қалпына келетін үрдістер санатына жататын CpG-аралықтардың ДНҚ – метилтрансферазалармен өзгертілуі өз кезегінде пролиферацияның негізгі гендерінің транскрипциялық белсенділігін немесе жасушалардың өсуі мен өшуіне қатысатын транскрипция факторларын өзгертеді. Көптеген гендер сүт безінің қатерлі ісігін ерте анықтаудың биомаркерлері ретінде ұсынылады. Осы орайда сүт безі қатерлі ісігінің арнайы диагностикалық эпигенетикалық факторларының бірі болып табылатын DOK7 генінің промоторлық аймағының гиперметилденуін атап өтсе болады. Сүт безі қатерлі ісігі бар науқастардың аралас эпигенетикалық терапиясы ісікке қарсы синергиялық жауап көрсетеді

Қорытынды. Қазіргі таңда «үндемей қалған» гендерді қайта экспрессияға ұшырататын ДНҚ – метилтрансфераза ингибиторларының көмегімен аберранты метилденуге қол жеткізілетін диагностикалау және емдеу тәсілдері белгілі және қолданыста. Гендердің промоторлерінде анықталатын аберрантты метилдену онкологиялық трансформацияның белгісі болып табылады, оларды өз кезегінде түрлі сұйықтықтағы (қан, плазма) инвазивті емес биомаркер ретінде сүт безі қатерлі ісігінің ерте диагностикасы үшін қолдануға болады. Дегенмен осы кезде емдеу барысында жеткілікті арнайылық пен сезімталдыққа ие бірегей биомаркер жоқ болуы себепті әр терапиялық жағдай үшін бірнеше гендердің панелін қолданған дұрыс. Осылайша, эпигенетика әдістері орасан зор диагностикалық және терапиялық потенциалға ие.

Түйінді сөздер: молекулалық – генетикалық әдістер, эпигенетика, ДНҚ – метилденуі, сүт безі қатерлі ісігі, биомаркер.

ABSTRACT

**A.B. Askandirova¹, N.A. Omarbayeva¹,
A.Z. Abdrakhmanova¹, T.G. Goncharova¹,
M.G. Orazgalieva¹, D.G. Adylbai¹, R.E.
Kadyrbayeva¹**

¹Kazakh Institute of Oncology and Radiology,
Almaty, the Republic of Kazakhstan

The role of epigenetic research in diagnostics and treatment of breast cancer

Relevance: Genetic mutations play an essential role in the development of malignant tumors; still, the part of epigenetic processes can also be significant. Epigenetic changes are not inherited and do not violate the DNA nucleotide sequence. However, they can critically change their accessibility for the transcriptional apparatus of the cell by chemical modification of specific chromosomal loci and associated genes. Acetylation and methylation of histones or DNA are examples of epigenetic changes. Epigenetic activation/deactivation of genes is the basis for the differentiation of all types of somatic cells. A change in the specific “epigenetic labeling” of a cell of a particular type causes cell de-differentiation or results in changing its phenotype (transdifferentiation). Given the scale of epigenetic regulation, it is logical that any violations of this process can lead to pathologies, including cancer.

This paper reviews the modern approaches and methods of study of the molecular genetic basis for the development of malignant tumors and epigenetic mechanisms, in particular, DNA methylation in breast cancer.

Purpose of the study is to review and analyze the existing molecular genetic methods for studying DNA methylation in breast cancer.

Results: DNA methylation is a critical mechanism of epigenetic modification, which is involved in gene expression programming and can contribute to the development of cancer, including breast cancer. Methylation of CpG islands of DNA methyltransferase, which is usually reversible, modifies the transcriptional activity of key proliferation genes or transcription factors involved in cell growth suppression or stimulation.

Many genes can serve as biomarkers for early detection of breast cancer. For example, the researchers have detected hypermethylation of the DOK7 gene promoter portion, which is one of the diagnostic specific epigenetic markers of breast cancer. The study results we have analyzed show that combined epigenetic therapy leads to a synergistic antitumor response in patients with breast cancer [1-9].

Conclusion: The currently available diagnostic and treatment methods aimed at aberrant methylation with DNA methyltransferase inhibitors trigger the repeated expression of “silent” genes and make it possible to increase the effectiveness of treatment. Aberrant methylation found in gene promoters is a sign of oncological transformation that can serve as a non-invasive biomarker in body fluids (blood, plasma) for early detection of breast cancer. However, there is currently no unique biomarker that would have sufficient specificity and sensitivity for use in therapy. Therefore, for a particular therapeutic case, a panel of several genes is required.

Thus, the methods of epigenetics were found to have vast diagnostic and therapeutic potential.

Keywords: molecular and genetic methods, epigenetics, DNA methylation, breast cancer, biomarker.