

REFERENCES

1. Vorsanova SG, Yurov YuB, Chernyshov VN. [Medical cytogenetics (manual)]. Moskow: Medpraktika-M; 2006. Russian.
2. Zerova-Lyubimova TE. [Cytogenetic researches of chromosomes of the person: methodical recommendations]. Kyiv; 2003. Ukrainian.
3. Andreeva SV, Drozdova VD, Ponochevnaya EV, Kavardakova NV. [Reorganizations of chromosome 9 in various hematologic neoplaziyakh]. Tsitologiya i genetika. 2008;5:72-79. Russian.
4. Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and Adolescence lymphoid and Myeloid Leukemia. Hematology Amer. Soc. Hematol. Educ. Program. 2004;118-145.
5. Gilliland DG. Targeted therapies in myeloid leukemia. Acute leukemias XI. Prognostic factors and treatment strategies. Ann. Hematol. 2004;83(1): 75-76.
6. Human Cytogenetics. A practical approach. Malignancy and acquired abnormalities. Eds D.E. Rooney, B.H. Czepulkovsky. New York: Oxford Univ. press., 1995;293.
7. Meldipour P, Mirfakhraie R, Jahani M, Meldipour AR. Karyotype evolution: cytogenetics follow_up study in children acute lymphoblastic leukemia. Asian Pac. J. Cancer Prev. 2003;4:358-68.
8. Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1993;81(1):2237-51.



УДК 618.19-006.6-06:577.215/.216

**В.М. Запорожан,
В.В. Бубнов,
В.Г. Марічереда,
Ю.Ю. Петровський,
Д.Ю. Андронов**

**ОЦІНКА ІНФОРМАТИВНОСТІ СТУПЕНЯ
МЕТИЛЮВАННЯ ДНК ГЕНА DKK4
ЯК ДІАГНОСТИЧНОГО КРИТЕРІЮ ПРИ
АДЕНОКАРЦИНОМІ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

*Одеський національний медичний університет
пров. Валіхівський, 2, Одеса, 65082, Україна
Odessa National Medical University
In. Valihovskyy, 2, Odessa, 65082, Ukraine
e-mail: andronov_d@bk.ru*

Ключові слова: метилювання ДНК, ген DKK4, CG сайт, аденокарцинома молочної залози.
Key words: DNA methylation, DKK4 gene, CG site, breast adenocarcinoma

Реферат. Оценка информативности степени метилирования ДНК гена DKK4 как диагностического критерия при аденокарциноме молочной железы. Запорожан В.Н., Бубнов В.В., Маричереда В.Г., Петровский Ю.Ю., Андронов Д.Ю. Аномалии метилирования ДНК играют значительную роль в возникновении и развитии онкологических заболеваний. Целью данного исследования была оценка значимости количественного определения гиперметилювания первого экзона гена DKK4 в качестве биомаркера опухолевой трансформации эпителиальных клеток молочной железы больных аденокарциномой 2-3 стадии. Анализ метилирования был проведен методом количественного пиросеквенирования с использованием набора PSQ96MA фирмы Qiagen. Установлено, что содержание метилированной ДНК гена DKK4 в образцах ткани аденокарциномы молочной железы значительно выше, чем в образцах неизменной ткани молочной железы, взятых от этих же больных. Так содержание метилированной ДНК при раке молочной железы в среднем составило 36,8±12,63 процента, тогда как в образцах условно нормальной ткани молочной железы – 19,37±7,1 процента, $p \leq 0,01$. Из 23 образцов ткани аденокарциномы молочной железы высокий уровень содержания метилированной ДНК первого экзона гена DKK4 был выявлен в 20 образцах (86,96 %, $p \leq 0,01$); в 3 образцах уровень метилированной ДНК был сопоставим с содержанием в образцах условно нормальной ткани.

Abstract. Evaluation of informativeness of DNA methylation degree of DKK4 gene as a diagnostic criterion in breast adenocarcinoma. Zaporozhan V.N., Bubnov V.V., Marichereda V.G., Petrovsky Yu.Yu., Andronov D.Yu. Abnormalities of DNA methylation play a significant role in initiation and progression of tumors. The aim of the study was the evaluation of the quantitative determination of hypermethylation of DKK4 gene first exon as a biomarker of the breast epithelial cells malignant transformation in patients with adenocarcinoma (2-3 stage). The analysis of DNA methylation was performed by quantitative pyrosequencing using the set PSQ96MA (Qiagen, USA). It was established that DKK4 methylated DNA content in breast adenocarcinoma tissue samples significantly exceeds the same indexes in the unchanged breast tissue taken from the same patients. The average methylated DNA level in conditions of breast cancer equals to $36,8 \pm 12,63$ percents whereas the same normal breast indexes equal to $19,37 \pm 7,1$ percents, $p \leq 0,01$. The increased content of methylated DNA in DKK4 gene first exon was revealed in 20 samples of breast adenocarcinoma tissues out of 23 (86.96%, $P \leq 0,01$); in the rest 3 samples the investigated content of methylated DNA was comparable with the same index in the normal breast tissues.

Оцінка ролі метилювання в «мовчанні» генів і геномної нестабільності уважно вивчається протягом останніх років [1, 5]. Метилювання ДНК визнано фундаментальним епігенетичним механізмом, який необхідний для нормального ембріонального розвитку, регуляції поділу клітин, диференціювання, апоптозу [2, 5, 12]. При цьому неправильне гіпер- або гіпометилювання ДНК може призводити до низки генетичних захворювань, включаючи новоутворення [4]. Метилювання цитозину, за яким слідує гуанін (метилювання CpG), є найбільш широкодослідженою епігенетичною модифікацією в організмі людини [9, 11].

Метилювання цитозину в першому екзоні генів призводить до їх інактивації шляхом блокування транскрипції. При скринінгу клітинних ліній колоректального раку карцином була показана висока частота одночасного метилювання всіх генів сімейства SFRP [5]. Було також доведено, що втрата функції генів SFRP при їх метилюванні супроводжувалося активацією Wnt-сигнального шляху в клітинних лініях колоректального раку. Гени DKK-сімейства також є інгібіторами активації Wnt-регуляторного каскаду та гальмують ріст пухлин. Епігенетична інактивація цих генів призводить до активації пухлинного росту в експерименті [13, 14].

Вивчення ролі епігенетичної модифікації першого екзону гена DKK4 може бути цікава для оцінки можливості використання метилювання цього гена в діагностиці та прогнозі перебігу раку молочної залози.

Мета дослідження – оцінка значущості кількісного визначення гіперметилювання першого екзону гена DKK4 як біомаркера пухлинної трансформації епітеліальних клітин молочної залози.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

До групи дослідження ввійшли 23 жінки, з підтвердженим діагнозом аденокарциноми молочної залози 2-3 стадії, які були комплексно обстежені відповідно до вимог діючих клінічних протоколів, регламентованих наказами МОЗ Ук-

раїни (№ 582 від 15.12.2003 та № 676 від 31.12.2004). Обстеження проведено на клінічних базах кафедри акушерства та гінекології № 1 Одеського національного медичного університету. Всі жінки, які були включені в дослідження, дали інформовану згоду.

Дослідження метилювання генів DKK4 проводили на біопсійному матеріалі 23 зразків аденокарциноми молочної залози і 22 зразків незміненої тканини молочної залози від цих же хворих. Геномна ДНК була виділена за допомогою наборів GeneJET DNA Purification Kit (Thermo scientific, USA). Бісульфітна обробка геномної ДНК була виконана згідно з протоколом до набору EpiTect Bisulfite kit (Qiagen, Germany). Після бісульфітної обробки ДНК, що було виділене, проведена ампліфікація методом TouchDown ПЛП з HotStartTag DNA Polymerase. Для ампліфікації використовували набір Fermentas Maxima Hot Start PCR Master Mix PCR kit (Thermo scientific, USA) і 5 пкмоль специфічних праймерів: $95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ хв.}$, $10 \text{ циклів} - 95^{\circ}\text{C} - 30 \text{ сек.}$, $65^{\circ}\text{C} - 1 \text{ хв.}$, зі зниженням температури на $1 \text{ градус} / \text{цикл.}$; $40 \text{ циклів} - 94^{\circ}\text{C} - 30 \text{ сек.}$, $60^{\circ}\text{C} - 45 \text{ сек.}$, $72^{\circ}\text{C} - 45 \text{ сек.}$; $72^{\circ}\text{C} - 10 \text{ хв.}$

Дизайн праймерів здійснювали за допомогою програми MethylPrimer Express v 1.0 (Applied Biosystems, USA).

Аналіз метилювання було проведено методом кількісного піросеквенування з використанням набору PSQ96MA компанії Qiagen і 10 пкмоль специфічних праймерів, що секвенують до першого екзону гена DKK4 згідно з методикою (Qiagen, Germany). Кількісний аналіз метилювання проводили на піросеквенаторі PyroMark Q96 MD і PyroMark Q24 MDX за допомогою програми Pyro Q-CpG Software (Qiagen, Germany). Програма автоматично обчислює ступінь метилювання CpG сайтів у пробі та показує його у відсотках для кожного сайту метилювання. Дані були оброблені методами непараметричної статистики за Фрідманом.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення епігенетичних механізмів регуляції розвитку, росту і старіння, а також порушення цих механізмів, що призводить до виникнення різних захворювань, у тому числі й онкологічних, відіграє велике значення в розумінні механізмів онкогенезу. Для оцінки можливості використання метилювання промотору гена DKK4 як діагностичного маркера було проведено вивчення вмісту метилованої ДНК цього гена в зразках тканини аденокарциноми й

умовно нормальної тканини молочної залози, що було взято від цих же хворих.

У першому екзоні гена DKK4 є чотири CG сайти, в яких метилюється цитозин у клітинах аденокарциноми молочної залози. На рисунках 1 і 2 представлені результати визначення рівня метилювання гена DKK4 методом піросеквенування. На рисунках, що представлені, показано вміст метилованої ДНК для кожного CG сайту гена DKK4 у зразку тканини аденокарциноми молочної залози і в умовно нормальної тканини.

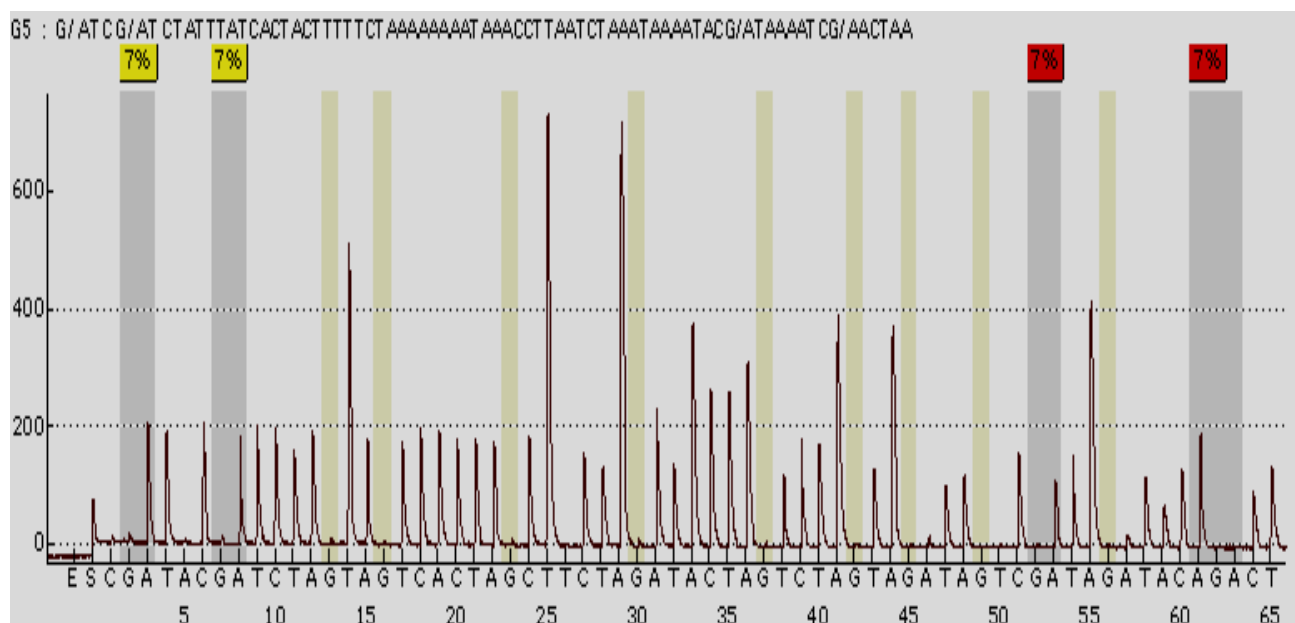


Рис. 1. Вміст метильованих CG сайтів у першому екзоні гена DKK4 в зразку незміненої тканини молочної залози

Примітка: відсоток метилованої ДНК в CG (або GT для комплементарного ланцюга) сайтів вказано зверху графіка

Вміст метилованої ДНК першого екзону гена DKK4 у зразках тканини аденокарциноми молочної залози значно вище, ніж у зразках незміненої тканини молочної залози, що було взято від цих же хворих. Так рівень метилованої ДНК у зразках аденокарциноми молочної залози в середньому становив $36,8 \pm 12,63$ відсотка, тоді як у зразках умовно нормальної тканини молочної залози – становив $19,37 \pm 7,1$ відсотка, з достовірністю $p \leq 0,01$. Із 23 зразків тканини аденокарциноми молочної залози високий рівень вмісту метилованої ДНК першого екзону гена DKK4 було виявлено в 20 зразках (86,96%, $p \leq 0,01$); у 3 зразках рівень метилованої ДНК був порівняний зі вмістом у зразках умовно нормальної тканини.

Низький рівень вмісту метилованої ДНК гена DKK4 було виявлено в 21 зразку незміненої тканини молочної залози, у двох зразках із 23 – вміст метилованої ДНК було порівняно з таким, що і в зразках тканини аденокарциноми (34 і 35%).

На рисунку 3 наведено усереднений аналіз порівняння вмісту метилованої ДНК гена DKK4 у зразках аденокарциноми та тканини молочної залози, що незмінена. Чутливість і специфічність кількісної оцінки вмісту метилованої ДНК гена DKK4 аденокарциноми молочної залози, що було розраховано за допомогою програми MedCalc, становила 86,9% і 91,3% відповідно.

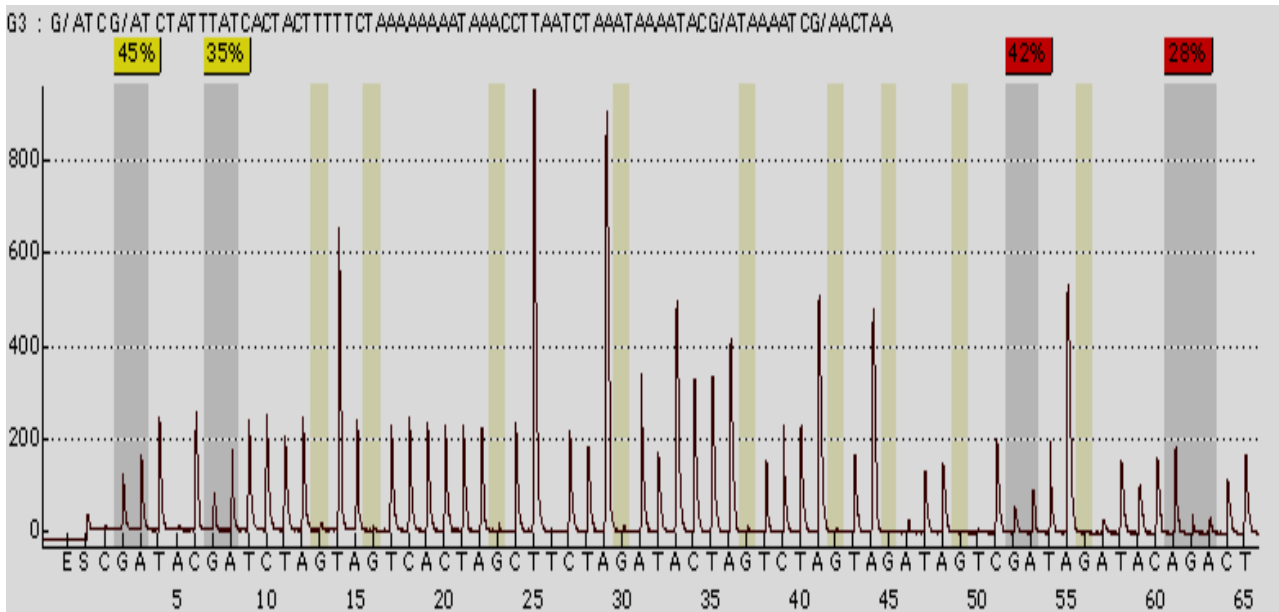


Рис. 2. Вміст метильованих CG сайтів у першому екзоні гена DKK4 у зразку тканини аденокарциноми молочної залози

Примітка: відсоток метилованої ДНК в CG (або GT для комплементарного ланцюга) сайтів вказано зверху графіка

Wnt/beta-catenin клітинний регуляторний шлях є необхідним для нормального ембріонального розвитку й диференціювання клітин. Аберантна активація цього шляху призводить до блокування апоптозу, диференціювання клітин, підвищенню мітотичного індексу [11, 13]. Функціонування Wnt шляху пов'язано з ключовим ефектором – бета-катеніном. У неактивному стані цитоплазматичний бета-катенін піддається фосфорилуванню та подальшій деградації в протеосомах. Активація Wnt регуляторного шляху пов'язана із взаємодією чинників зростання Wnt з

мембранним рецептором (сімейство Frizzled рецепторів), перешкоджаючи тим самим деградації бета-катеніну. Транслокація останнього в ядро та взаємодія з транскрипційними факторами призводить до активації генів мішеней, функція яких пов'язана з активацією проліферації (Cycline, C-myc та ін.). Гени DKK1, 2,3,4, WIF1 запобігають індукції сигналізації, впливаючи на Frizzled рецептори і LRP5-6 ко-рецептор, і є інгібіторами Wnt/beta-catenin клітинного регуляторного шляху [3, 10].

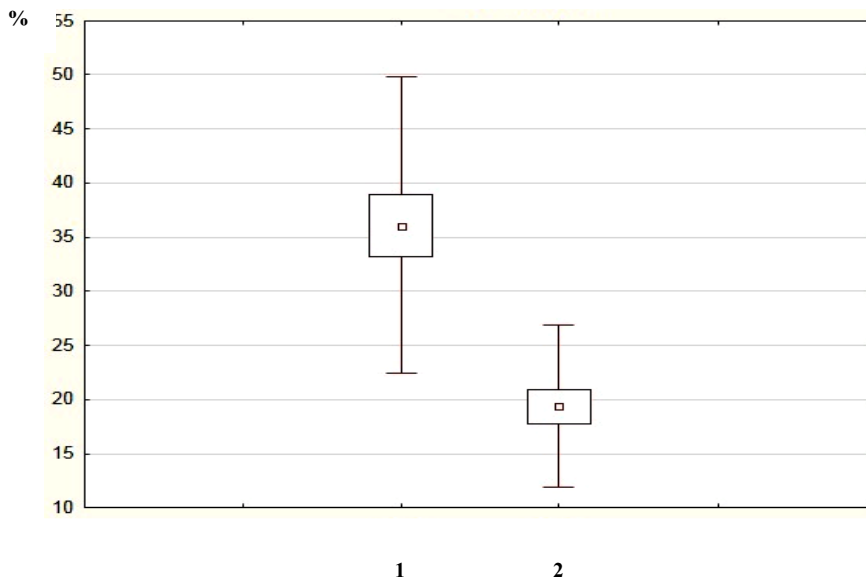


Рис. 3. Усереднений аналіз порівняння вмісту метилованої ДНК за CG сайтами у першому екзоні гена DKK4 у зразках тканини аденокарциноми молочної залози (1) та нормальної тканини молочної залози (2)

Оскільки ген DKK4 є інгібітором Wnt регуляторного клітинного шляху, який бере участь у регуляції проліферації і пухлинному рості, то метилювання гена DKK4 може призводити до інгібування його функції, тим самим сприяючи активації проліферації і росту пухлини [7, 8, 12].

ВИСНОВКИ

1. При кількісній оцінці вмісту метилюваної ДНК за CG сайтами першого екзону гена DKK4 було виявлено високий вміст метилюваної ДНК у зразках тканини аденокарциноми молочної залози ($36,8 \pm 2,63\%$), яке було значно вище, ніж у незмінній тканині молочної залози, взятій від цих же хворих ($19,87 \pm 1,47\%$, $p \leq 0,001$)

2. Чутливість кількісного визначення вмісту метилюваної ДНК гена DKK4, що було розраховано за допомогою програми MedCalc, становить $86,9\%$, а специфічність – $91,3\%$, що дозволяє рекомендувати його як біомаркер для ранньої діагностики аденокарциноми молочної залози.

3. Метод піросеквенування, запропонований для аналізу метилювання першого екзону гена DKK4, є швидким, надійним і високоспецифічним методом, що дозволяє кількісно визначити вміст метилюваної ДНК у зразках тканини молочної залози.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Correction of PCR-bias in quantitative DNA methylation studies by means of cubic polynomial regression / E.A. Moskalev, M.G. Zavgorodnij, S.P. Majorova [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — Vol. 39. — e77.

2. Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation / L. Zhang, X. Gao, J. Wen, Y. Ning [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2006. - Vol. 281. - P. 8607-8612.

3. Deletions of chromosome 8p and loss of SFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer / R. Stoehr, C. Wissmann, H. Suzuki [et al.] // *Lab. Invest.* — 2004. — Vol. 84. — P. 465–478.

4. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma / L.B. Bennett, J.L. Schnabel, J.M. Kelchen [et al.] // *Genes Chromosomes Cancer.* — 2009. — Vol. 48. — P. 828–841.

5. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer / O. Aguilera, M.F. Fraga, E. Ballestar [et al.] // *Oncogene.* — 2006. — Vol. 25. — P. 4116–4121.

6. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer / H. Suzuki, D.N. Watkins, K.W. Jair [et al.] // *Nat. Genet.* — 2004. — Vol. 36. — P. 417–422.

7. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer / M. Nojima, H. Suzuki, M. Toyota [et al.] // *Oncogene.* — 2007. — Vol. 26. — P. 4699–4713.

8. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer / H. Suzuki, M. Toyota, H. Caraway [et al.] // *Br. J. Cancer.* — 2008. — Vol. 98. — P. 1147–1156.

9. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/beta-catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing / T.O. Yau, C.Y. Chan, K.L. Chan, [et al.] // *Oncogene.* — 2005. — Vol. 24. — P. 1607–1614.

10. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors / E. Klopocki, G. Kristiansen, P.J. Wild [et al.] // *Int. J. Oncol.* — 2004. — Vol. 25. — P. 641–649.

11. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators / C. Niehrs // *Oncogene.* — 2006. — Vol. 25. — P. 7469–7481.

12. Polakis P. Wnt signaling and cancer / P. Polakis // *Genes Dev.* — 2000. — Vol. 14. — P. 1837–1851.

13. Kawano Y. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway / Y. Kawano, R. Kypta // *J. Cell Sci.* — 2003. — Vol. 116. — P. 2627–2634.

14. Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo / R.K. Gandhirajan, P.A. Staib, K. Minke [et al.] // *Neoplasia.* — 2010. — N 12. — P. 326–335.

REFERENCES

1. Moskalev EA, Zavgorodnij MG, Majorova SP, Vorobjev IA, Jandaghi P, Bure IV, Hoheisel JD. Correction of PCR-bias in quantitative DNA methylation studies by means of cubic polynomial regression. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:e77.

2. Zhang L, Gao X, Wen J, Ning Y, Chen YG. Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *J Biol Chem.* 2006;281:8607–12.

3. Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H. et al. Deletions of chromosome 8p and loss of SFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab. Invest.* 2004;84:465–78.

4. Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, Papageorgio CN, Shi H, Caldwell CW. DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48:828–41.

5. Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Muñoz A, Esteller M, González-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene.* 2006;25:4116–21.

6. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW. et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 2004;36:417–22.
7. Nojima M, Suzuki H, Toyota M. et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene.* 2007;26:4699–713.
8. Suzuki H, Toyota M, Caraway H. et al. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2008;98:1147–56.
9. Yau TO, Chan CY, Chan KL, Lee MF, Wong CM, Fan ST, Ng IO. HDPR1, a novel inhibitor of the WNT/beta-catenin signaling, is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma: involvement of methylation-mediated gene silencing. *Oncogene.* 2005;24:1607–14.
10. Klopocki E, Kristiansen G, Wild PJ. et al. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. *Int. J. Oncol.* 2004;25:641–9.
11. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene.* 2006;25:7469–81.
12. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000;14:1837–51.
13. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J. Cell Sci.* 2003;116:2627–34.
14. Gandhirajan RK, Staib PA, Minke K, Gehrke I, Plickert G, Schlösser A, Schmitt EK, Hallek M, Kreuzer KA. Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Neoplasia.* 2010;12:326–35.



УДК 618.14:616-006.36-089:612.6

**В.О. Потапов,
Ю.В. Донська,
М.В. Медведєв**

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ГІПЕРПЛАЗІЇ ЕНДОМЕТРІЯ У ЖІНОК З ЛЕЙОМІОМОЮ МАТКИ

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»
кафедра акушерства і гінекології
(зав. – д. мед. н., проф. В.О. Потапов)
вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна
SE "Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine"
Department of Obstetrics and Gynecology
Dzerzhinsky str., 9, Dnipropetrovsk, 49044, Ukraine
e-mail: medvedev.mv@gmail.com*

Ключові слова: лейоміома матки, гіперплазія ендометрія, консервативна міомектомія, органозберігаюче лікування, агоністи ГнРГ, КОК

Key words: uterine leiomyoma, endometrial hyperplasia, myomectomy, conservative treatment, GnRH agonists, OCPs

Реферат. Современные подходы к лечению гиперплазии эндометрия у женщин с лейомиомой матки. Потапов В.А., Донська Ю.В., Медведєв М.В. В исследовании принимало участие 155 женщин, из них 30 практически здоровых женщин составили контрольную группу. 125 женщин с лейомиомой матки и гиперплазией эндометрия составили основные группы. Было проведено рандомизированное исследование новой схемы применения агонистов ГнРГ совместно с КОК после консервативной миомэктомии. Методики сравнения включали монотерапию а-ГнРГ, гестагены (дидрогестерон) либо КОК. Проведенное лечение с использованием различных медикаментозных схем терапии гиперплазии эндометрия после миомэктомии убедительно продемонстрировало достоверно большую эффективность комбинации а-ГнРГ с КОК в отношении снижения частоты симптомов этих заболеваний, выразительности менструальной кровопотери и повышения качества жизни в весь период наблюдения. Большая эффективность применения комбинации КОК и а-ГнРГ, по нашему мнению, связана с большей степенью супрессии пролиферации и ангиогенеза как за счет локального воздействия (КОК), так и на системном уровне (а-ГнРГ). Таким образом, предложенный метод адьювантной терапии после миомэктомии для женщин с сопутствующей гиперплазией эндометрия имеет значительные клинические преимущества с минимальным воздействием на минеральную плотность костной ткани и другие климактерические проявления, вызванные монотерапией а-ГнРГ.