

**І.Я. Скрипкіна<sup>1</sup>, О.Г. Кондратов<sup>1</sup>, Л.О. Циба<sup>1</sup>, Г.В. Панасенко<sup>1</sup>,  
О.В. Ніколаєнко<sup>1</sup>, А.М. Романенко<sup>2</sup>, О.О. Колесник<sup>3</sup>, Д.Є. Мордерер<sup>1</sup>,  
К.А. Некрасов<sup>1</sup>, В.І. Кашуба<sup>1</sup>, С.О. Возіанов<sup>2</sup>, І.Б. Щепотін<sup>3</sup>, А.В. Риндич<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup> Державна установа «Інститут урології АМН України», Київ

<sup>3</sup> Національний інститут раку, Київ

## **ВИЯВЛЕННЯ ПОЗАКЛІТИННОЇ ДНК ТА ГЕН-СПЕЦИФІЧНОГО МЕТИЛУВАННЯ В ПЛАЗМІ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ З РАКОМ НИРОК ТА ТОВСТОЇ КИШКИ**



Статус метилування деяких генів та рівень концентрації позаклітинної ДНК (пкДНК) в крові є важливим діагностичним критерієм, пов'язаним з виникненням злоякісних пухлин. Проведені нами дослідження показали, що рівень пкДНК у крові пацієнтів з раком нирок та товстої кишки вищий, ніж у здорових донорів. Метилування CpG-острівців генів *LRRС3В*, *APC* та *FHIT* було виявлено у 33,3; 27,8 і 33,3 % пацієнтів з раком нирок та у 14,3; 28,5 і 19 % пацієнтів з раком товстої кишки відповідно. У здорових донорів метилування досліджуваних генів виявлено не було. Запропоновано методики для кількісної оцінки пкДНК в плазмі крові та аналізу статусу метилування маркерних генів з метою виявлення порушень в організмі людини, пов'язаних з розвитком онкологічних хвороб.

**Ключові слова:** позаклітинна ДНК плазми крові, рак нирки, рак товстої кишки, метил-специфічна ПЛР, гені-маркери злоякісних пухлин.

Виявлення хворих на рак товстої кишки та нирок на сьогодні малоефективне у зв'язку з переважно безсимптомним перебігом ранніх стадій цих захворювань. У економічно розвинутих країнах рак нирок складає 2–2,5 % усіх випадків онкологічної патології. Тривожним фактом є те, що з невідомих причин захворюваність на рак нирок у всьому світі впродовж останніх років постійно зростає на 2–4 % щороку, тобто швидше, ніж на інші типи пухлин [1]. У свою чергу рак товстої кишки є третім

найбільш поширеним видом раку в усьому світі. Проблеми ранньої діагностики захворювань, відсутність надійних та широко вживаних прогностичних та діагностичних терапевтичних маркерів потребують термінового вирішення. На сьогодні виявлення передракових станів та ракових захворювань на ранній стадії вважається найбільш ефективним засобом зниження рівня смертності.

Відомо, що при багатьох видах раку часто спостерігаються аберації 3-ї хромосоми людини. Показано, що на цій хромосомі розташовані десятки потенційних генів-супресорів, нормальне функціонування яких запобігає розвитку злоякісних новоутворень, а їх втрата або інактивація супроводжуються прогресією пух-

© І.Я. СКРИПКІНА, О.Г. КОНДРАТОВ, Л.О. ЦИБА,  
Г.В. ПАНАСЕНКО, О.В. НІКОЛАЄНКО,  
А.М. РОМАНЕНКО, О.О. КОЛЕСНИК,  
Д.Є. МОРДЕРЕР, К.А. НЕКРАСОВ, В.І. КАШУБА,  
С.О. ВОЗІАНОВ, І.Б. ЩЕПОТІН, А.В. РИНДИЧ, 2012

лин. Алельні делеції на 3p відмічаються вже на передракових стадіях, проте інактивация генів-супресорів пухлин часто пов'язана не лише з делеціями і мутаціями, а й з метилуванням CpG-острівців у промоторних ділянках генів [2, 3].

У попередніх дослідженнях нами було проведено широкомасштабне порівняння генетичних (делеції, ампліфікації) та епігенетичних (метилування) порушень генів 3-ї хромосоми людини при різних типах злоякісних пухлин епітеліального походження, при цьому була використана унікальна технологія гібридизації NotI-мікрочіпів, що містять NotI-геномні клони 3-ї хромосоми [4, 5]. У результаті було виявлено гени, порушення яких є універсальними і специфічними для карцином різної локалізації (нирки, товста кишка, яєчники, шийка матки, молочна залоза). Зокрема, для раку нирок було ідентифіковано 15 генів, а для раку товстої кишки — 33 гени, порушення яких спостерігались більше ніж у 30 % досліджуваних випадків, причому для деяких генів частота виявлених змін досягала 78 % [5, 6].

Аналіз сучасних даних дає підставу вважати, що значний прогрес у ранній діагностиці раку може бути досягнутий завдяки визначенню епігенетичних порушень, таких, як ген-специфічне метилування, оскільки аберантне гіперметилування пухлинної ДНК може детектуватися в сироватці чи плазмі крові. Ще у 1977 році Леон і співавт. [7] описали підвищення рівня вільно циркулюючої позаклітинної ДНК (пкДНК) у плазмі крові хворих на рак у порівнянні зі здоровими особами. Використання пакДНК як потенційного діагностичного маркера пухлин було підтверджено пізніше різними групами для різних типів злоякісних новоутворень [8, 9]. Визначення концентрації пакДНК та статусу метилування деяких генів у сироватці чи плазмі крові дозволяє запропонувати прогресивну та менш інвазивну тест-систему для скринінгу населення.

Дана робота присвячена оптимізації наявних та створенню нових методичних підходів з аналізу статусу метилування вибраних генів-мар-

керів та визначенню концентрації пакДНК для впровадження в діагностичну практику з метою раннього виявлення порушень в організмі людини, пов'язаних з розвитком онкологічних хвороб, зокрема раку нирок та товстої кишки.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Тестування проводили на зразках, що були отримані з крові хворих на рак (передопераційний забір крові) та потенційно здорових людей (донори, співробітники ІМБіГ НАН України) за їх згоди. У дослідженнях використовували 27 зразків плазми крові пацієнтів з раком нирок (Інститут урології АМН України, м. Київ), 21 зразок плазми крові пацієнтів з раком товстої кишки (Національний інститут раку, м. Київ) та 15 зразків здорових донорів (табл. 1).

**Виділення позаклітинної циркулюючої ДНК з плазми крові пацієнтів.** Забір крові проводили в пластикові пробірки об'ємом 5 мл, що містили ЕДТА (етилендіамінтетраоцтову кислоту). Кров відстоювали протягом 2—4 год при +4 °С, ретельно відбирали вільну від еритроцитів фракцію крові, переносили у нові центрифужні пробірки і поетапно центрифугували при +4 °С, кожен раз переносячи супернатант у нову центрифужну пробірку: 1500 об./хв протягом 7 хв, 1800 об./хв — 8 хв, 2200 об./хв —

Таблиця 1

Медичні дані пацієнтів з раком нирок та товстої кишки, плазму крові яких використовували для аналізу

Пацієнти з раком нирок	Кількість пацієнтів	Пацієнти з раком товстої кишки	Кількість пацієнтів
Вік >55	20 (74,1 %)	Вік >55	16 (76,2 %)
Вік <55	7 (25,9 %)	Вік <55	5 (23,8 %)
стадія 1—2	4 (14,8 %)	стадія 1—2	16 (76,2 %)
стадія 3—4	23 (85,2 %)	стадія 3—4	5 (23,8 %)
T <sub>1a+b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0-x</sub>	13 (48,1 %)	T <sub>2</sub> N <sub>0-2</sub> M <sub>0</sub>	4 (19 %)
T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0-x</sub>	7 (25,9 %)	T <sub>3</sub> N <sub>0-x</sub> M <sub>0-1</sub>	6 (28,6 %)
T <sub>3</sub> N <sub>0-1</sub> M <sub>1-x</sub>	4 (14,8 %)	T <sub>4</sub> N <sub>0-x</sub> M <sub>0-1</sub>	11 (52,4 %)
TNM не визнач.	3 (11,1 %)		

10 хв. Плазму зберігали при  $-70^{\circ}\text{C}$ . ДНК виділяли з 2 мл плазми методом повного осадження нуклеїнових кислот, використовуючи набір ПРОБА-НК (ДНК-технології, Росія).

**Визначення концентрації пкДНК непрямим методом.** До 195 мкл розчину барвника Sybr Green I (1:10 000, «Thermo Scientific», США) у буфері 1xPBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7.4) додавали 5 мкл зразка або таку ж кількість стандартного розчину геномної ДНК відомої концентрації (від 0,05 до 50 нг/мкл) і витримували 10 хв. Флуоресценцію отриманих сумішей вимірювали у двох-трьох повторах за допомогою флуориметра «Victor Multilabel Cjunter 1420» виробництва «Perkin Elmer» (США) з використанням фільтрів FITC (485/535 нм) і накопиченням сигналу 1 с. Концентрацію ДНК у зразках розраховували за допомогою статистичних функцій програмного забезпечення Microsoft Excel 2007, виходячи з рівнів флуоресценції стандартних розчинів.

**Визначення концентрації пкДНК методом кількісної ПЛР у реальному часі.** Отриману ДНК попередньо розбавляли у співвідношенні 1 : 10 у деіонізованій воді і 5 мкл очищеної ДНК плазми ампліфікували з використанням 0,3 мкМ кожного праймера до гена  $\beta$ -актину (АСТВ-F 5'-CCACACTGTGCCCATCTACG-3' і АСТВ-R 5'-AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG-3') і 0,25 мкМ флуоресцентного зонда (5' FAM-ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT-BHQ1 3'). ПЛР проводили за таких умов: 10 хв при температурі  $95^{\circ}\text{C}$ , потім 40 циклів по 15 с при  $95^{\circ}\text{C}$  і 1 хв при  $60^{\circ}\text{C}$ . Кількісні стандартні криві були одержані з використанням серій розбавленої геномної ДНК людини відомої концентрації. Флуоресценції ампліфікованих продуктів ПЛР виявляли за допомогою системи детекції в реальному часі BioRad iQ5 («BioRad», США). Результати аналізу представляють середнє з трьох незалежних експериментів, кожен з яких проводився у двох повторах. Статистичний аналіз отриманих даних був проведений за допомогою про-

грамного забезпечення Microsoft Excel 2007. Достовірність відмінностей між вибірками визначали за критерієм  $t$  Стьюдента.

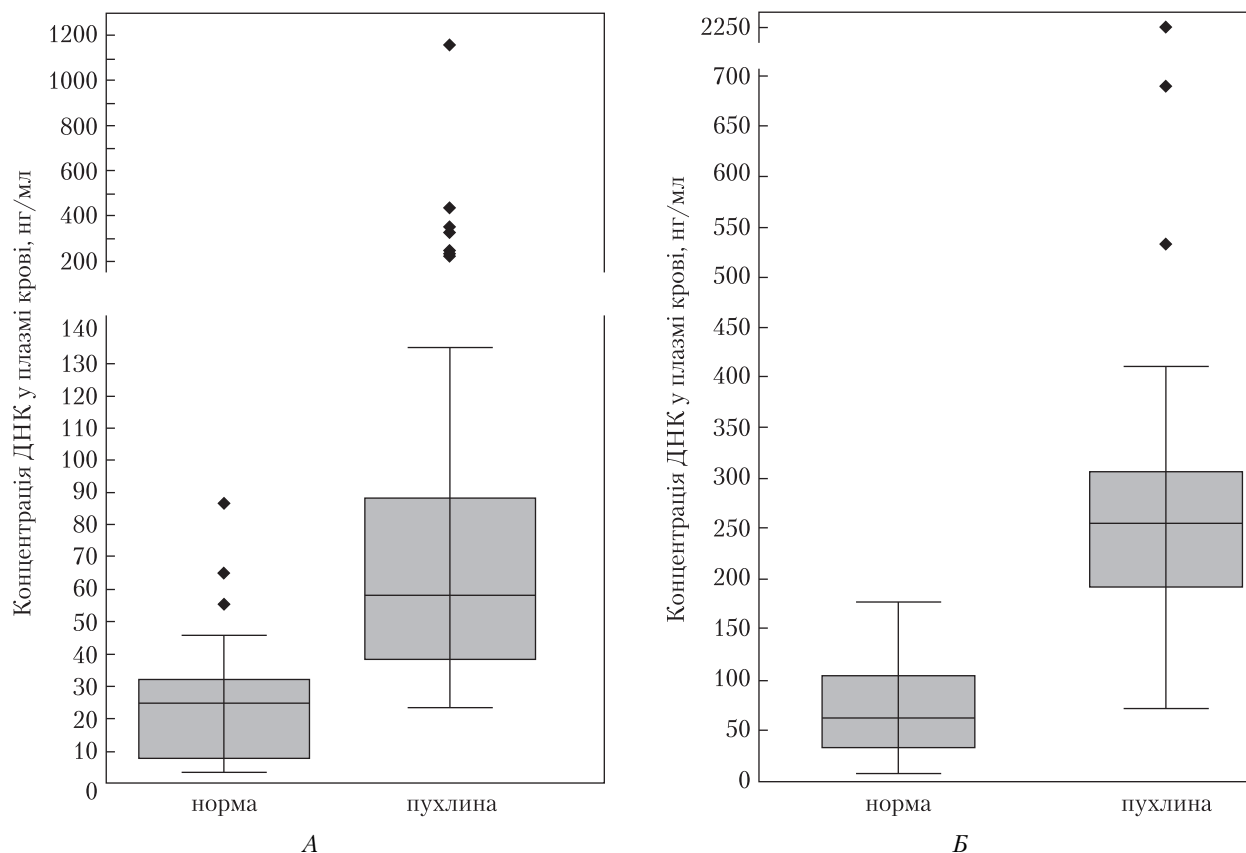
#### **Визначення статусу метилування генів.**

Для перевірки метилування спочатку проводили бісульфітну обробку виділеної ДНК за допомогою набору E.Z.DNA Methylation Kit («Zymo Research Corporation», США). Визначення метилування проводили методом метил-специфічної ПЛР (МС-ПЛР). Реакційна суміш складалася з 12,5 мкл 1x розчину SYBR Green PCR Mix («Thermo Scientific», США), 2 мкл бісульфітно-обробленої ДНК, 10 пмоль кожного праймера та води, загальним об'ємом 25 мкл. МС-ПЛР проводили з праймерами до генів FHIT (5'-TTGGGGCGCGGGTTTGGGTTTTTACGC-3' та 5'-CGTAAACGACGCCGACCCACTA-3'), LRRC3B (5'-GGTGCAGGAAGGTAGGC-3' і 5'-ACCAATACCTCGCCGACG-3') та APC (5'-TATTGCGGAGTGCGGGTGC-3' і 5'-TCGACGAACCTCCCGACGA-3'). Для ідентифікації очікуваних фрагментів проводили аналіз кривих плавлення ампліфікованих з SYBR Green I продуктів та електрофорез ПЛР-продуктів у 2%-ому агарозному гелі.

**Визначення нуклеотидної послідовності ДНК.** Визначення нуклеотидної послідовності фрагментів ДНК, отриманих за допомогою МС-ПЛР, проводили з використанням набору для секвенування («BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit») та прямого праймера до ПЛР-продукту згідно з інструкцією виробника за допомогою автоматичного ДНК-секвенатора «Genetic Analyser 3130» («Applied Biosystems», США). Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення «Sequencing Analysis» («Applied Biosystems») та Chromas 1.55 («Technelysium LTD», Австрія). Вирівнювання нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою алгоритму ClustalW (VectorNTI 10, «Invitrogen», США) та сервісу BLASTN (NCBI).

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Для коректного аналізу рівня циркулюючої пкДНК в крові слід дуже ретельно відділити



Порівняння концентрації позаклітинної ДНК, виділеної із зразків плазми пацієнтів з раком нирок та здорових донорів: *A* – концентрацію ДНК визначали кількісною ПЛР в реальному часі ( $\rho = 0,015$ ); *B* – концентрацію ДНК визначали методом інтеркаляції флуоресцентного барвника Sybr Green I ( $\rho = 0,074$ )

ДНК-вмісні клітини крові від плазми/сироватки, аби помилково не отримати завищені рівні ДНК, які не відповідають реальним процесам в організмі. З цією метою нами було відпрацьовано поетапне м'яке центрифугування/фракціонування клітин крові таким чином, щоб у процесі отримання безклітинної складової не підвищити рівень циркулюючої пкДНК за рахунок вивільнення хромосомальної ДНК з лейкоцитарної фракції. Отриману плазму використовували для налагодження методики виділення пкДНК крові, а в подальшому брали по 2 мл для виділення ДНК обраним методом з подальшим визначенням її концентрації та аналізом статусу метилування.

Абсолютна концентрація пкДНК у плазмі крові та сироватці може бути важливою для

встановлення діагнозу (в поєднанні з іншими лабораторними та клінічними параметрами), прогнозу і моніторингу терапії у пацієнтів з раком, сепсисом, інсультом, опіками та після травм [10–12]. Аналіз результатів досліджень, опублікованих протягом останніх років, вказує на значну розбіжність у концентрації пкДНК, виявленої у плазмі крові пацієнтів при різних експериментах (від кількох нг/мл до декількох сотень нг/мл плазми), що можна пояснити, в першу чергу, різними методами виділення пкДНК та оцінки її концентрації, а також індивідуальними особливостями пацієнтів. Проте незалежно від вибору протоколу рівень пкДНК у крові хворих на рак вищий, ніж у здорових донорів [13].

З використанням методу повного осадження нуклеїнових кислот нами було виділено пкДНК з плазми крові пацієнтів з раком нирки, раком товстої кишки та здорових донорів. Визначення концентрації отриманої пкДНК з плазми крові 27-и пацієнтів з раком нирки та 15-и здорових донорів проводили двома методами: за рівнем флуоресценції інтеркаляційного барвника Sybr Green I та шляхом кількісної ПЛР у реальному часі до послідовності гена  $\beta$ -актину.

Результати вимірювання рівнів флуоресценції барвника Sybr Green I показали, що концентрація пкДНК у плазмі хворих знаходиться в межах від 11 до 2249 нг/мл (медіана — 254 нг/мл), а в плазмі здорових донорів — від 4 до 426 нг/мл (медіана — 57 нг/мл), достовірність  $p = 0,074$  (рисунок, А). Кількісна ПЛР у реальному часі показала статистично достовірне збільшення концентрації пкДНК в крові онкохворих (23 — 1176 нг/мл плазми, медіана — 58 нг/мл) у порівнянні зі здоровими донорами (3 — 88 нг/мл плазми, медіана — 25 нг/мл), достовірність  $p = 0,015$  (рисунок, Б).

Відмінності в абсолютних значеннях концентрації пкДНК, визначеної двома різними методами, можуть бути наслідком підвищеного вмісту низькомолекулярної ДНК у зразках, виділених із плазми пацієнтів та донорів, порівнюючи з контрольною ДНК, розведення якої використовували для ПЛР у реальному часі. Одержані результати узгоджуються з даними інших досліджень, згідно з якими визначення концентрації пкДНК з використанням флуоресцентних барв-

ників дає вищі абсолютні значення, ніж метод кількісної ПЛР у реальному часі [14].

Проведені нещодавно експерименти також показали підвищений вміст пкДНК у крові хворих на рак нирок у порівнянні зі здоровими донорами [15, 16], хоча виявлені концентрації пкДНК були нижчими від визначених нами концентрацій, що може свідчити про більш ефективний спосіб виділення пкДНК у нашій роботі, а також може бути пов'язано з вибором рідкого компонента крові для аналізу, а саме сироватки.

Враховуючи те, що рівень пкДНК не може бути специфічним маркером раку нирок, ми проаналізували можливість використання пкДНК для визначення статусу метилування генів-маркерів. У попередніх роботах з аналізу статусу метилування промоторних ділянок генів 3-ї хромосоми за допомогою методики NotI-мікрочіпів були визначені гени, метилування яких спостерігалось в зразках злоякісних пухлин нирок та товстої кишки. Серед них як потенційні маркери пухлиноутворення були вибрані гени, для яких була показана досить висока частота метилування в цих пухлинах. Один з цих генів, що мав 56,5 % метилування для раку нирок і 60 % для раку товстої кишки — ген-супресор *LRRC3B* (leucine-rich repeat containing 3B) [5, 6]. Гіперметилування його промоторної ділянки пов'язують з розвитком раку товстої кишки та раку шлунку [17, 18]. Підвищене метилування промотора цього гена показано і в клітинних лініях карциноми нирок [19]. Серед генів, що картовані на 3-ій хромосомі, але не представлені на NotI-мікрочіпах, було обрано ген *FHIT*, відомий як потенційний супресор пухлин [20]. Раніше у наших роботах було показано гіперметилування цього гена в зразках пухлин нирок (54,5%) [21]. Ген *APC*, вибраний також як потенційний маркер пухлин, картований на 5-ій хромосомі людини. Для нього характерне підвищене метилування промотора при онкогенезі, а численні мутації цього гена пов'язані з багатьма порушеннями організму, в тому числі і з розвитком раку товстої кишки [22, 23].

Таблиця 2

Частота метилування генів *FHIT*, *LRRC3B* та *APC* у зразках плазми крові хворих на рак нирок та товстої кишки

Метилування генів	Частота метилування		
	Рак нирок, %	Рак товстої кишки, %	Здорові донори
<i>FHIT</i>	33,3	19	0
<i>LRRC3B</i>	33,3	14,3	0
<i>APC</i>	27,8	28,5	0

Для перевірки метилування ДНК її попередньо піддавали бісульфитній обробці, після чого ставили ПЛР у реальному часі з праймерами, підібраними для проведення метил-специфічної ампліфікації. Умови МС-ПЛР було розроблено та відпрацьовано на ДНК, штучно метилованій за допомогою SssI-метилтрансферази. Специфічність отриманих продуктів МС-ПЛР підтверджували шляхом визначення їхньої нуклеотидної послідовності.

МС-ПЛР було проведено на пкДНК 18-ти пацієнтів з раком нирок та 21-го пацієнта з раком товстої кишки, використовуючи праймери до генів *FHIT*, *LRRC3B* та *APC*. Результати показали, що метилування гена *FHIT* спостерігалось у 33,3 % зразків раку нирок та 19 % зразків раку товстої кишки. Метилування гена *LRRC3B* виявили у 33,3 % пацієнтів з раком нирок та у 14,3 % з раком товстої кишки. Промотор гена *APC* був метилованим у 27,8 % випадків раку нирок та у 28,5 % раку товстої кишки. У здорових донорів метилування досліджуваних генів виявлено не було. Результати представлені в табл. 2.

### ВИСНОВКИ

Одержані нами дані свідчать про підвищений рівень пкДНК у плазмі крові пацієнтів з раком нирок та товстої кишки та можливості детекції епігенетичних порушень (метилування промоторних регіонів) генів, асоційованих з цими патологіями у пкДНК крові. У результаті проведених досліджень підібрано оптимальний метод виділення пкДНК з плазми крові, розроблено та підібрано методики кількісної оцінки пкДНК плазми крові методами інтеркаляції флуоресцентного барвника та ПЛР у реальному часі, підібрано умови проведення метил-специфічної ПЛР для генів, асоційованих з раком нирок та товстої кишки — *LRRC3B*, *APC* та *FHIT*. За одержаними результатами концентрація вільно циркулюючої пкДНК у плазмі крові та наявність метилування CpG-острівців генів *LRRC3B*, *APC* та *FHIT* можуть бути використані для неінвазив-

ної діагностики злоякісних пухлин та бути рекомендовані для впровадження в профільних закладах системи охорони здоров'я та медико-генетичних лабораторіях.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Garcia J.A., Rini B.I. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma // *C.A. Cancer. J. Clin.* — 2007. — V. 57, № 2. — P. 112–125.
2. Rynditch A., Pekarsky Y., Schnittger S. et al. Leukemia breakpoint region in 3q21 is gene rich // *Gene.* — 1997. — V. 193, № 1. — P. 49–57.
3. Pekarsky Y., Rynditch A., Wieser R. et al. Activation of a novel gene in 3q21 and identification of intergenic transcripts with EV11 in leukaemia // *Cancer. Research.* — 1997. — V. 57, № 18. — P. 3914–3919.
4. Кашуба В.И., Скрипкина И.Я., Сараев Д.В. и др. Использование NotI-микрочипов для идентификации изменений в локусах генов, потенциально участвующих в развитии рака шейки матки // *Ukr. Biokhim. Zh.* — 2006. — Т. 78, № 2. — С. 49–56.
5. Скрипкина И.Я., Кашуба В.И., Гордишук В.В. та ін. Идентифікація змін в локусах генів, які потенційно задіяні в розвитку раку нирок, за допомогою нової технології NotI-микрочипів // *Доповіді академії наук України.* — 2006. — № 11. — С. 188–192.
6. Gerashchenko G.V., Gordiyuk V.V., Skrypkina I.Y. et al. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer // *Ukr. Biokhim. Zh.* — 2009. — V. 81, № 4. — P. 81–87.
7. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M. and Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // *Cancer Res.* — 1977. — V. 37, № 3. — P. 646–650.
8. Chang H.W., Goodman S.N., Singer G. et al. Assessment of plasma DNA levels, allelic imbalance, and CA 125 as diagnostic tests for cancer // *J Natl. Cancer Inst.* — 2002. — V. 94. — P. 1697–1703.
9. Ellinger J., Bastian P.J., Haan K.I. et al. Noncancerous PTGS2 DNA fragments of apoptotic origin in sera of prostate cancer patients qualify as diagnostic and prognostic indicators // *Int J Cancer.* — 2008. — V. 122, № 1. — P. 138–143.
10. Jung K., Fleischhacker M., Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker — A critical appraisal of the literature // *Clinica. Chimica. Acta.* — 2010. — V. 411. — P. 1611–1624.
11. Fleischhacker M., Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer — A survey // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2007. — V. 1775. — P. 181–232.
12. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers // *Curr. Mol. Med.* — 2010. — V. 10. — P. 142–165.

13. *Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K.* Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients // *Nat. Rev. Cancer.* — 2011. — V. 11, № 6. — P. 426–437.
14. *Czeiger D., Shaked G., Eini H. et al.* Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2011. — V. 135, № 22. — P. 64–70.
15. *Martino M., de Klatte T., Haitel A. and Marberger M.* Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker // *Cancer.* — 2012. — V. 18, № 1. — P. 82–90.
16. *Hauser S., Zahalka T., Ellinger J. et al.* Cell-free Circulating DNA: Diagnostic Value in Patients with Renal Cell Cancer // *Anticancer Research.* — 2010. — V. 30. — P. 2785–2790.
17. *Tian X.Q., Zhang Y., Sun D. et al.* Epigenetic silencing of LRRC3B in colorectal cancer // *Scand J Gastroenterol.* — 2009. — V. 44, № 1. — P. 79–84.
18. *Kim M., Kim J.H., Jang H.R. et al.* LRRC3B, encoding a leucine-rich repeat-containing protein, is a putative tumor suppressor gene in gastric cancer // *Cancer Res.* — 2008. — V. 68, № 17. — P. 7147–7155.
19. *Kondratov A.G., Stoliar L.A., Kvasha S.M. et al.* Methylation pattern of the putative tumor-suppressor gene LRRC3B promoter in clear cell renal cell carcinomas // *Mol. Med. Report.* — 2012. — V. 5, № 2. — P. 509–512.
20. *Pekarsky Y., Garrison P.N., Palamarchuk A. et al.* Fhit is a physiological target of the protein kinase // *Src. Proc Natl Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101, № 11. — P. 3775–3779.
21. *Kvasha S., Gordiyuk V., Kondratov A. et al.* Hypermethylation of the 5' CpG island of the FHT gene in clear cell renal carcinomas // *Cancer Lett.* — 2008. — V. 265, № 2. — P. 250–257.
22. *Brock M.V., Hooker C.M., Ota-Machida E. et al.* DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — V. 358, № 11. — P. 1118–1128.
23. *Rowan A.J., Lamlum H., Ilyas M. et al.* APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational «hotspot» and interdependence of the «two hits» // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97, № 7. — P. 3352–3357.

*И.Я. Скрипкина, А.Г. Кондратов, Л.А. Цыба,  
Г.В. Панасенко, А.В. Николаенко, А.М. Романенко,  
Е.А. Колесник, Д.Е. Мордерер, К.А. Некрасов,  
В.И. Каиуба, С.А. Возианов, И.Б. Щепотин, А.В. Рындич*

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК И ГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ПОЧЕК И ТОЛСТОЙ КИШКИ

Статус метилирования некоторых генов и уровень концентрации внеклеточной ДНК (вкДНК) крови является

важным диагностическим критерием, связанным с возникновением злокачественных опухолей. В результате проведенных исследований нами показано, что уровень вкДНК в крови пациентов с раком почек и толстой кишки выше, чем у здоровых доноров. Метилирование CpG-островков генов LRRC3B, APC и FHT было обнаружено у 33,3; 27,8 и 33,3 % пациентов с раком почек и у 14,3; 28,5 и 19 % пациентов с раком толстой кишки соответственно. У здоровых доноров метилирование исследованных генов обнаружено не было. Предложено методики для количественной оценки вкДНК в плазме крови и анализа метилирования маркерных генов с целью обнаружения нарушений в организме человека, связанных с развитием онкологических болезней.

*Ключевые слова:* внеклеточная ДНК плазмы крови, рак почки, рак толстой кишки, метил-специфическая ПЦР, гены-маркеры злокачественных опухолей.

*I.Ya. Skrypkinia, O.G. Kondratov, L.O. Tsyba,  
G.V. Panasenko, O.V. Nikolaienko, A.M. Romanenko,  
O.O. Kolesnyk, D.Ye. Morderer, K.A. Nekrasov, V.I. Kashuba,  
S.O. Vozianov, I.B. Shchepotin, A.V. Rynditch*

#### DETECTION OF CELL-FREE DNA AND GENE-SPECIFIC METHYLATION IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH RENAL AND COLON CANCER

Gene-specific methylation and concentration of cell-free DNA in blood can be important tools for the early diagnosis of cancer. Here, we have shown that total cell-free DNA levels were higher in patients with renal and colon cancer compared to healthy individuals. The results indicated that cell-free DNA can be used for detection of hypermethylation of cancer marker genes. CpG islands of LRRC3B, APC and FHT genes were hypermethylated in 33,3 %; 27,8 % and 33,3 % of patients-with renal cancer and in 14,3 %; 28,5 % and 19 % of patients with colon cancer, respectively. Hypermethylation of LRRC3B, APC and FHT was not detected in cell-free DNA of healthy individuals. We have proposed the methods for quantitative analysis of cell-free DNA in blood plasma and detection of the methylation of marker genes, which could be useful for diagnostics of cancer.

*Key words:* cell-free DNA, renal cancer, colon cancer, methyl-specific PCR, tumor marker genes.

Стаття надійшла до редакції 26.04.12