

УДК 616.329-577.2

©Коллектив авторов

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ ПИЩЕВОДА: МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Е.Н. Колесников, Н.Н. Тимошкина*

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт,
344037, Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63, эл. почта: dvodolazhsky@gmail.com

Аденокарцинома и плоскоклеточный рак относятся к наиболее распространенным типам злокачественных новообразований пищевода с постоянной тенденцией к росту заболеваемости на фоне высокой смертности, что делает особо актуальным поиск новых биомаркеров, дополняющих и улучшающих раннюю диагностику этого заболевания. Несмотря на внушительное количество исследований, в рутинной клинической практике используется единственный маркер рака пищевода – статус ERBB2/HER2. В настоящем обзоре обобщены данные об эпигенетических маркерах, характеризующих аберрантное метилирование генома, которые могут оказаться полезными для раннего обнаружения рака пищевода, прогноза и/или предсказания ответа на лечение. Развитие новых высокопроизводительных технологий полногеномного скрининга, таких как “BeadChip array” и иммунопреципитация с последующим секвенированием, используемых не только для полногеномного генотипирования, но и для анализа транскриптома и метилома, позволяет получить комплексные картины генетических и эпигенетических изменений в ходе онкогенеза.

Ключевые слова: рак пищевода, метилирование, биомаркеры

DOI 10.18097/PBMC20166205520

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивое снижение смертности от основных злокачественных новообразований (рак лёгкого, толстой кишки, предстательной железы у мужчин, рак молочной железы у женщин) привело к снижению общей смертности, вызванной онкологическими заболеваниями [1]. В то же время наблюдается тенденция к повышению частоты рака пищевода: в 2012 году в России зарегистрировано 7299 случаев этого вида рака, что на 2,2% больше по сравнению с 2007 годом [2]. Аденокарцинома (esophageal adenocarcinoma – EAC) и плоскоклеточный рак пищевода (esophageal squamous cell carcinoma – ESCC) вместе занимают восьмое место в мире по распространённости и шестое место – среди причин смертности от онкологических заболеваний [1].

ESCC и EAC различаются по клиническим и биохимическим признакам. ESCC, как полагают, развивается из гиперпролиферирующего эпителия, или эпителиальной дисплазии (Epithelial Dysplasia), которая прогрессирует от низкой и средней к эпителиальной дисплазии высокой степени и последующему инвазивному раку. Большинству случаев EAC предшествует предзлокачественное состояние, именуемое пищеводом Барретта (BE – Barrett's esophagus), которое характеризуется замещением многослойного плоского эпителия метапластическим цилиндрическим эпителием. BE считается успешной адаптацией дистального отдела пищевода в ответ на хроническое воздействие гастроэзофагального рефлюкса (Gastroesophageal reflux disease – GERD) [3]. Как правило, последующее направленное развитие от дисплазии низкой степени (low-grade dysplasia) к дисплазии высокой

степени (high-grade dysplasia) может привести к инвазивному EAC. Такая последовательность событий сопряжена с эпигенетическими и генетическими изменениями, регистрация которых молекулярно-биологическими методами помогает как в определении патогенетических механизмов, так и в разработке биомаркеров диагностики и стратификации риска, прогноза и предсказания ответа на химио- и таргетную терапию [4].

Для обнаружения патологических изменений, ведущих к развитию EAC, наиболее распространённому типу рака пищевода в европейской и североамериканской популяциях, современная клиническая практика предлагает эндоскопическое обследование больных групп высокого риска с GERD. В процессе исследования оценивают степень дисплазии биоптатов, собранных во время эндоскопии [5]. Однако многие данные свидетельствуют о несовершенной классификации дисплазии как меры оценки риска развития рака. Несмотря на масштабность усилий, более 80% случаев EAC идентифицируют без предварительного диагноза BE и/или GERD. С другой стороны, согласно статистическим данным, у большей части пациентов, прошедших скрининг, EAC не развивается [6], то есть возможности выявления пациентов с высоким риском развития рака пищевода и дифференциации его прогрессирующей формы от непрогрессирующей весьма ограничены. Таким образом, необходимость поиска молекулярных биомаркеров приводит к развитию исследований в этой области [7, 8]. В частности, описаны несколько гистологических и одновременно генетических изменений, характерных для ESCC и EAC: особенности метилирования и экспрессии ДНК, изменение копияности и

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ ПИЩЕВОДА

стабильности ДНК, и т.п. Эти данные могли бы дополнить гистологический анализ на уровне предиктивной диагностики, несмотря на то, что молекулярные события, которые контролируют процессы малигнизации тканей пищевода, на сегодняшний день ясны не полностью [9].

На пути от дисплазии к раку клетки приобретают способность к самодостаточному росту и уклонению от апоптоза, а также к бесконтрольному размножению, стимуляции ангиогенеза, вторжению в подстилающий эпителий и метастазированию. Эти события сопровождаются гистологическими изменениями в архитектуре ткани, нестабильностью генома, изменением микроокружения опухоли и иммунного ответа, которые могут быть зафиксированы молекулярными методами в образцах тканей и/или жидкостях организма. Хорошо известна роль гиперметилирования промоторов генов-супрессоров опухолей в развитии EAC и ESCC. За три десятилетия исследований в этой области накоплен обширный

материал. В таблице собраны некоторые данные о частоте гиперметилирования ряда генов при предраковом состоянии и раке пищевода.

1. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК ТКАНЕЙ

Подавление (сайленсинг) транскрипции генов-супрессоров в процессе онкогенеза часто осуществляется посредством гиперметилирования их регуляторных участков. Однако геном раковых клеток в целом гипометилирован по сравнению с геномом нормальных клеток (рисунок). В ранних исследованиях по поиску изменений метилирования в опухолевых тканях внимание было направлено на известные гены-супрессоры и онкогены, затем тактика сместилась в сторону панелей метилирования многих локусов [8].

В работах, посвящённых изучению молекулярных механизмов онкотрансформации пищевода, отмечалось, что для компенсации повреждений тканей

Таблица. Гиперметилирование некоторых генов в малигнизированных тканях и при предраковых состояниях пищевода

Гены	Частота гиперметилирования, (%)		Ссылки
	Предраковое состояние	Рак	
CDKN2A: Ингибитор циклин-зависимой киназы 2A	N (0-10); ED1 (4-31); ED2 (12-42); ED3 (14-33)	ESCC (40-52)	[11, 30]
	BE (46); LGD (33); HGD (33)	EAC (16)	[12]
MGMT: O ⁶ -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза	N (6); ED1 (8-23); ED2 (4-17); ED3 (14-11)	ESCC (33-39)	[11, 30]
	N (21); BE (89); LGD (100)	EAC (79)	[31]
APC: ген аденоматозного полипоза толстой кишки	N (0); ED1 (3); ED2 (0); ED3 (0)	ESCC (13)	[30]
	N (0); BE (40-85); LGD (83); HGD (66)	EAC (42-92; 25)	[12, 13]
DAB2: клатрин-адапторный протеин		ESCC (20)	[32]
MLH1: MutL гомолог 1, ген неполипозного рака толстой кишки 2-го типа	N (6); ED1 (8); ED2 (17); ED3 (33)	ESCC (23)	[30]
RAR β 2: RAR-β-связанный орфанный рецептор	N (0); ED1 (0-13); ED2 (8-33); ED3 (10-44)	ESCC (36)	[11, 30]
ESR1: Рецептор эстрогенов 1 типа	BE (69); LGD (100); HGD (67)	EAC (100)	[12]
CDH1: Кадгерин 1	N (18); ED1 (10); ED2 (17); ED3 (33)	ESCC (34)	[30]
	BE (8); LGD (0); HGD (0)	EAC (0)	[12]
SOCS-1, SOCS-3: Супрессор сигнального пути цитокинов 1 и 3	BE <i>SOCS-3</i> (13); <i>SOCS-1</i> (0); HGD <i>SOCS-3</i> (69), <i>SOCS-1</i> (21); LGD <i>SOCS-3</i> (22), <i>SOCS-1</i> (4)	EAC <i>SOCS-3</i> (74); <i>SOCS-1</i> (42)	[33]
DAPK: Death-ассоциированная протеинкиназа 1	N (0); ED1 (28); ED2 (25); ED3 (11)	ESCC (26)	[30]
	BE (50), any dysplasia (53)	EAC (60)	[26]
TIMP-3: Ингибитор металлопротеиназ 3	BE (72)	EAC (90)	[15]
DACT2: Disheveled-связывающий антагонист бета-катенина 2	N (0), ED (35,7)	ESCC (69)	[34]

Примечание: N - нормальная ткань; ESCC - плоскоклеточный рак пищевода; EAC - аденокарцинома пищевода; IND - неидентифицированная дисплазия; ED1/LGD - дисплазия низкой степени; ED2 - дисплазия средней степени; ED3/HGD - дисплазия высокой степени; BE - пищевод Барретта.

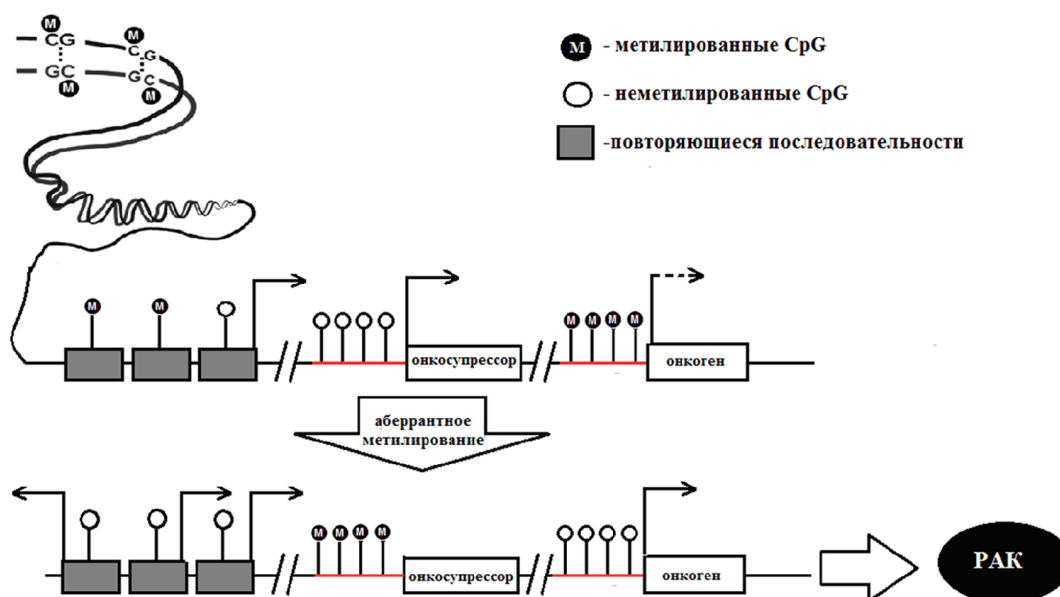


Рисунок. ДНК метилирование и рак. В ходе онкогенеза происходит CpG-метилирование *de novo*, в том числе промоторных участков (выделено красным цветом), а также умеренно и часто повторяющихся последовательности гетерохроматина. Эти эпигенетические изменения в опухолевых клетках становятся причиной соответственно транскрипционного замолкания генов онко-супрессоров, активной транскрипции протоонкогенов, потере импринтинга перичесентромерным гетерохроматином, что способствует нестабильности генома путём увеличения частоты рекомбинаций.

желудочными/желчными кислотами в ходе развития ВЕ эпителий начинает быстрее делиться, но для этого клетки должны снять ограничения пролиферации в сигнальных путях регуляции клеточного цикла [8]. Один из таких способов – инактивация белка p16 (CDKN2A), который останавливает клеточный цикл в фазе G1, блокируя фосфорилирование белка RB. Изменение экспрессии *p16* при ЕАС было определено иммуногистохимическими методами [10]. Таким образом, выявлено снижение транскрипционной активности *p16* путём гиперметилирования регуляторных участков кодирующего его гена *CDKN2A*.

Определение паттернов метилирования гена *p16*, а также ещё трех локусов (*AHRR*, *MT1G* и *CLDN3*) в цитологическом материале использовали для дискриминации ранних стадий плоскоклеточной дисплазии и малигнизации тканей пищевода. Однако низкая чувствительность и специфичность (50 и 68% соответственно) не позволили заявить о скрининговых возможностях этого подхода [11].

Данные о статусе метилирования гена *CDKN2A* дополнили оценкой гиперметилирования промоторов другого набора генов (*APC*, *ESR1* и *CDH1*) [12] в шести операционных биоптатах ВЕ-ассоциированной ЕАС. Для создания пространственных карт метилирования был использован “объёмный” подход: анализировали 107 срезов каждого образца. Нормальные ткани пищевода отличало отсутствие метилирования всех четырёх маркеров. Высокая частота метилирования генов *ESR1*, *APC* и *CDKN2A* обнаружена в участках ВЕ, ВЕ-дисплазии и ЕАС, тогда как метилирование *CDH1* отсутствовало почти во всех образцах. Этот подход вместе с данными об aberrantном метилировании генетических локусов в смежных

областях, прилежащих к ВЕ, ВЕ-дисплазии и ЕАС ткани, позволили предполагать возможность малигнизации клеток или группы клеток посредством клональной экспансии [12]. Сходные результаты получены Kawakami и соавт. [13]. В образцах ЕАС и ESCC гиперметилирование *APC* определяли с частотой 92% (n=48/52) и 50% (n=16/32) соответственно, а также у 39,5% (n=17/34) пациентов с диагнозом ВЕ, но не в образцах прилегающих нормальных тканей пищевода. Обсуждалась также модель клональной экспансии на стадии ВЕ.

Как при воспалении, так и при метастазировании важную роль играют матриксные металлопротеиназы (ММР) – семейство протеолитических ферментов, участвующих в деградации компонентов внеклеточного матрикса. Иммуногистохимическими методами выявлена важная роль ММР и при раке пищевода [14]. Кроме того, обнаружена ассоциация между уровнями ингибиторов ММР (TIMP) и клиническими показателями. В частности, в работе Darnton и др. показано, что тканевый уровень TIMP-3 обратно пропорционально коррелирует со стадией опухоли и прямо – с выживаемостью пациентов [15]. Авторами выявлена статистически значимая ассоциация между прогрессией ВЕ/ЕАС и метилированием гена *TIMP-3*. Инактивирующее метилирование *TIMP-3* было обнаружено в одной из пяти клеточных линий рака пищевода (OE33), в 72% образцов ВЕ и в 90% ЕАС. В условно здоровой ткани метилирование данного гена отсутствовало. В этой же работе с использованием обработки культуры клеток OE33 деметилирующими агентами экспериментально подтвердили участие гиперметилирования *TIMP-3* в молекулярных механизмах малигнизации, при которой повышалась экспрессия белка TIMP-3 [15].

Противоположный процесс – снижение степени метилирования генов с последующей активацией онкогенов и мобильных элементов, повышающих нестабильность генома, также имеет значение для канцерогенеза. В работе Iwagami и соавт. [16] на 50-ти образцах ESCC показана статистически значимая ($p < 0,0008$) обратная корреляция между гипометилированием умеренно повторяющегося элемента LINE-1 и безрецидивной выживаемостью пациентов. Метилирование промотора LINE-1 в образцах ESCC было значимо меньше ($p = 0,0001$), чем в немалигнизированном плоском эпителии. В то же время гиперметилирование *MGMT* и *MLH1* не было связано с клиническими показателями при ESCC. Позже уточнили возможный молекулярный механизм ассоциации гипометилирования LINE-1 (как показателя гипометилирования генома в целом) с прогнозом развития ESCC. В частности, предполагалось, что опухоль приобретает способность к агрессивному росту в результате сверхэкспрессии таких онкогенов, как *CDK6* [17].

Гипометилирование LINE-1 и плохой прогноз заболевания связаны, по-видимому, и с неэффективностью химиотерапии, обусловленной повышенной экспрессией *MDR1* (определяет множественную лекарственную устойчивость) [18]. Помимо обратной корреляции между статусом метилирования LINE-1 и уровнем экспрессии *MDR1*, установленной при анализе 310 образцов ESCC, была предложена шкала индекса метилирования LINE-1 с пограничным значением $MI = 0,78$. Значения $MI \leq 0,78$ были характерны для пациентов более старшего возраста с прогрессирующей низко дифференцированной опухолью и с меньшим периодом выживания (34 месяца).

2. СКРИНИНГ БИОМАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Полногеномный скрининг паттернов метилирования генов широко используется как для изучения дифференцировки различных типов тканей с целью решения прикладных задач, так и определения цепи молекулярных событий, связанных с прогрессией предраковых состояний в рак. В одной из таких работ с использованием платформы Illumina Golden Gate, было показано, что нормальные клетки пищевода, BE и EAC имеют уникальные “профили метилирования”. Количество генов, необходимых для выделения гистологических групп по уровню метилирования, варьировало от 422, характерных для нормального эпителия и EAC, до трёх – для HGD и BE [19].

При помощи полногеномной амплификации метилированных CpG-островков (methylated CpG island amplification – MCA) и микрочипов Agilent 244K на CpG-островки генома человека оценили эпигенетические изменения при прогрессии опухоли [20]. Анализировали образцы, полученные от пациентов с BE, у которых предраковое состояние прогрессировало ($n = 5$) или не прогрессировало ($n = 4$). При прогрессии ожидаемо чаще обнаруживали гипометилирование генов роста и развития

(в отличие от гиперметилирования генов-супрессоров), в то время как в непрогрессирующих опухолях картина была противоположной, в том числе для генов, участвующих в сигнальном пути инсулина.

Изменения метилирования генома при прогрессии EAC изучали также с использованием комбинации микрочипов (для оценки степени метилирования ДНК и экспрессии генов) и сравнительной геномной гибридизации (CGH) на микрочипах (для оценки хромосомных перестроек). Получили результаты, свидетельствующие о существенном изменении метилома на ранней стадии канцерогенеза. Глобальное гипометилирование коррелировало с амплификацией генов, что приводило к усилению транскрипционной активности генов *CXCL1* и *CXCL3* (лиганды хемотаксических цитокинов), *GATA6* (фактор транскрипции) и гликопротеина *DMBT1* (медиатор иммунных реакций), которые могут служить функционально важными биомаркерами при проведении раннего скрининга пациентов с BE [21]. Комплексный подход, в котором оценивали изменение степени метилирования, копийность и экспрессию локусов в образцах нормального эпителия, BE, HGD и EAC одного пациента, позволил построить пространственно-временную модель изменения активности генов-супрессоров в ходе онкогенеза через гемизиготную мутацию (инактивирующая мутация с потерей второго аллеля) и биаллельную инактивацию с помощью метилирования промотора. Отметим, что была выявлена полная (100%) инактивация гена *CDKN2B* в результате прогрессирующего метилирования промотора и четырёхкратное падение уровня экспрессии мутантного гена *CDKN2A* при сохранённом статусе метилирования.

Выполненный с помощью технологии HELP-tagging параллельного секвенирования (Illumina) анализ метилома образцов нормального эпителия пищевода, BE и EAC, а также трёх клеточных линий EAC – FLO-1, OE33, SKGT4, и HEEpic – первичной культуры эпителиальных клеток пищевода, выявил общее гипометилирование генома при BE и EAC, в том числе участков, контролирующих транскрипцию некодирующих РНК. Особо была отмечена длинная некодирующая РНК *AFAP1-AS1*, которая строго гипометилирована в тканях BE и EAC. Подавление транскрипции гена *AFAP1-AS1* значительно уменьшало агрессивность клеточных линий OE33 и SKGT4 [22].

В двух опубликованных в 2016 году исследованиях была предпринята комплексная оценка метилирования генома разных типов рака пищевода, включающая определение профилей транскрипции [23] и изменения копийности, поиск мутаций с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS, Next Generation Sequencing) [24]. Сопоставление профилей метилирования ($n = 125$ EAC, 19 BE, 85 ESCC, 21 образец нормального пищевода) и транскрипции ($n = 48$ EAC, 4 BE и 18 ESCC) выявило статистически значимую корреляцию между степенью метилирования 63% из 5538 дифференциально метилированных генов и их экспрессией на уровне мРНК. Полученные данные позволили отличить образцы BE и EAC,

имеющие сходные профили метилирования, от образцов ESCC. Кроме того, выделили два подтипа ЕАС, один из которых характеризовался небольшим количеством сайтов гиперметилирования, а второй был ассоциирован с распространенным CpG-гиперметилированием, включая H3K27me3 и сайты связывания с белками Polycomb [23].

В другой работе с использованием полногеномного скрининга с помощью микрочипов Infinium HumanMethylation450 BeadChip array изучали метилирование генома ESCC (n=57) [24]. Показано, что для этого типа неопластического образования пищевода не характерно масштабное CpG-гиперметилирование, то есть CIMP-фенотип, однако получены уникальные для ESCC профили метилирования. В 33% случаев ESCC выявлено гиперметилирование генов *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4*, *Sfrp5*, *SOX17* и *WIF1*, обеспечивающих негативную регуляцию сигнального пути WNT. В 9% случаев отмечено aberrантное метилирование генов *CDKN2A* и *CHFR*. Более частыми событиями были соматические мутации (64 типа несинонимичных SNP в 77% образцов) и вариации копийности (35 типов CNV в 42% образцов). В целом, именно эпигенетические изменения были ответственны за активацию сигнального пути WNT, тогда как характерное для ESCC нарушение регуляции сигнального пути p53 и клеточного цикла было связано с генетическими изменениями: инактивирующими мутациями гена *TP53*, мутациями *CDKN2A*, делециями *CDKN2A* и *RB1* [24].

Отметим выявленную в этих двух работах, общую для разных гистотипов рака пищевода характеристику – активацию сигнального пути WNT, что даёт возможность использовать факторы регуляции этого пути в качестве потенциальных мишеней для таргетной химиотерапии.

Таким образом, использование комплексного подхода при проведении скрининговых исследований позволяет подойти к классификации рака пищевода с учётом эпигенетических изменений, специфичных для BE/ЕАС и ESCC.

3. МЕТИЛИРОВАННАЯ ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ДНК

Любые биомаркеры, для определения которых требуются образцы тканей, сложно использовать для проведения широкомасштабного скрининга, в том числе и из-за экономической нецелесообразности. Альтернативой тканевым источникам могут стать биомаркеры, циркулирующие в кровотоке. Одним из источников биомаркеров могут быть циркулирующие опухолевые клетки, однако, как правило, чувствительность существующих методов недостаточна для раннего обнаружения единичных опухолевых клеток [25].

Kawakami и соавт. [13] использовали внеклеточную циркулирующую ДНК. Они оценили метилирование гена *APC* в парных биоптатах опухоли, как упоминалось выше, и в плазме крови, содержащей свободно циркулирующую ДНК. В отличие от образцов опухоли, в которых гиперметилирование гена *APC* обнаружено на ранней

стадии развития ЕАС, в образцах плазмы подобных изменений зарегистрировать не удалось. Более того, одновременное гиперметилирование гена *APC* в образцах плазмы и в ткани ЕАС выявлено только в 24% случаев (48 из 52 образцов ткани против 13 из 52 образцов плазмы). Не исключено, что основная проблема в данном случае заключалась в ограниченной чувствительности метода и в незначительном количестве опухолевой ДНК в периферической крови на ранних стадиях заболевания.

Слабая выраженность метилирования гена *APC*, обнаруженная ранее [13], не исключает, очевидно, возможности использования этого параметра в качестве прогностического маркера. Предоперационный уровень метилирования генов *APC* и *DAPK* в периферической крови использовали для дискриминации пациентов с протяжёнными (>2,5 лет) и короткими периодами выживания. Чувствительность подобного подхода достигает 99,9%, а специфичность – 57,1% [26].

Изучение профиля метилирования свободно циркулирующей ДНК, очевидно, даст больше информации о потенциальных биомаркерах рака пищевода. В одной из первых подобных работ, используя платформу Infinium Human Methylation 27 Bead Chip (Illumina), показали идентичность профиля метилирования 27578 CpG-локусов в 14495 генах свободно циркулирующей ДНК и профиля метилирования, параллельно определённого в образцах опухолевой ткани ($r=0,92$) [27]. С помощью иерархической кластеризации удалось дискриминировать пробы ЕАС и контрольные образцы по 911 локусам, образцы ЕАС и BE – по 554, образцы BE и контрольные – по 46 локусам [27]. Очевидно, подобные исследования помогут в создании панели метилирования нескольких маркеров, в том числе в свободно циркулирующей ДНК, что может стать альтернативным подходом к скринингу населения с целью диагностики ранних стадий рака пищевода.

Таким образом, распространенные изменения метилома, встречающиеся прежде всего в предраковых состояниях, предшествующих дисплазии и развитию ESCC и ЕАС, могут эффективно использоваться в ранней диагностике рака пищевода, дискриминации разных стадий неоплазии, а также в качестве предикторов ответа на химиотерапию и выживаемости пациентов [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивный поиск биомаркеров рака пищевода дал материал для молекулярной характеристики ЕАС и ESCC, резко различающихся гистологически. Тем не менее, современная молекулярная классификация рака пищевода основана преимущественно на изменении копийности, потере гетерозиготности ряда локусов и наличии соматических мутаций в некоторых генах, почти не затрагивая эпигенетические изменения [9].

Многочисленные сообщения о значимых ассоциациях между стадиями развития рака

пищевода, ответом на лечение и прогнозом развития болезни и показателями метилирования ДНК, модификации гистонов, уровня экспрессии мРНК и микроРНК чрезвычайно полезны для понимания подробностей патогенеза и формулирования теоретической основы будущих методов лечения. Однако многие из этих исследований выполнены на относительно небольшой выборке пациентов. Более того, только малая часть исследований подкреплена статистически значимыми доказательствами. Об этом свидетельствуют результаты проведённого мета-анализа. Один из наиболее “свежих” обзоров [28] охватывал 4004 исследования, посвященных разработке биомаркеров рака пищевода и опубликованных до 24.08.2014 г. Из них в анализ были включены данные только 182. Несмотря на множественную выбраковку, некоторое количество вариантов оказалось надежным. Мета-анализ по 53 маркерам выживания или рецидива выявил существенные ассоциации шести соматических aberrаций (мутантные *TP53* и *PIK3CA*, увеличение числа копий *ERBB2/HER2*, *CCND1*, *FGF3* и хромосомная нестабильность/плоидность) и семи полиморфизмов. Кроме этого, значимыми были ассоциации трёх герминальных полиморфизмов с ответом на химиолучевую терапию. Высокой оценкой эти работы обязаны проспективным исследованиям с использованием методов высокопроизводительного секвенирования и экспрессии генов. Тем не менее, большинство биомаркеров, получивших высокую оценку, остаются на фазе 1-3 клинических испытаний. Только “*p16* lesion”, который включает гиперметилование, потерю гетерозиготности и определение последовательности *p16^{INK4a}*, находится на четвёртой стадии исследований (EDRN). А в рутинной клинической практике используется единственный маркер рака пищевода – статус *ERBB2/HER2* [29].

Основное препятствие для получения клинически полезных биомаркеров – отсутствие достаточно больших проспективных клинических испытаний. Этому есть объективные причины – отсутствие значительных хранилищ тканей пищевода с полной клинической аннотацией.

В целом, получены многочисленные доказательства aberrантного метилирования промоторов онкоассоциированных генов в малигнизированных тканях пищевода, что указывает на их значительный потенциал для разработки диагностических маркеров метилирования. Дальнейший анализ профилей метилирования генома, позволяющих различить различные стадии канцерогенеза пищевода, в виде проспективных клинических испытаний даёт надежду на разработку клинически востребованных биомаркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. (2014) C.A. Cancer J. Clin., **64**(1), 9-29.
2. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. (2014) под ред. Давыдова М.И., Акселя Е.М. М., Издательская группа РОНЦ, 226с.
3. Vakil N., van Zanten S.V., Kahrilas P., Dent J., Jones R. (2006) Am. J. Gastroenterol., **101**, 1900-1920.
4. Kum O.I., Водолажский Д.И. (2015) Молекулярная биология, **42**(4), 531-540.
5. Playford R.J. (2005) Gut, **55**, 442.
6. Reid B.J., Li X., Galipeau P.C., Vaughan T.L. (2010) Nat. Rev. Cancer, **10**, 87-101.
7. Dulak A.M., Schumacher S.E., van Lieshout J., Imamura Y., Fox C., Shim B., Ramos A.H., Saksena G., Baca S.C., Baselga J. et al. (2012) Cancer Res., **72**(17), 4383-4393.
8. Shah A.K., Saunders N.A., Barbour A.P., Hill M.M. (2013) Cancer Epidemiol. Biomarkers, **22**(7), 1185-1209.
9. Murphy A., Kelly R.J. (2015) Gastroenterol. Res. Pract., 896560.
10. Shi X.Y., Bhagwadeen B., Leong A.S. (2008) Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol., **16**, 447-452.
11. Adams L., Roth M.J., Abnet C.C., Dawsey S.P., Woodson K. (2008) Cancer Prev. Res. (Phila), **1**(5), 357-361.
12. Eads C.A., Lord R., Kurumboor S.K., Wickramasinghe K., Skinner M.L., Long T.I., Peters J.H., DeMeester T.R., Danenberg K.D., Danenberg P.V., Laird P.W., Skinner K.A. (2000) Cancer Res., **60**, 5021-5026.
13. Kawakami K., Brabender J., Lord R.V., Groshen S., Greenwald B.D., Krasna M.J., Yin J., Fleisher A.S., Abraham J.M., Beer D.G. et al. (2009) J. Natl. Cancer Inst., **92**, 1805-1811.
14. Grimm M., Lazariotou M., Kircher S., Stuermer L., Reiber C., Höfelmayr A., Gattenlöhner S., Otto C., Germer C.T., von Rahden B.H. (2010) J. Transl. Med., **8**, 99.
15. Darnton S.J., Hardie L.J., Muc R.S., Wild C. (2005) Int. J. Cancer, **115**, 351-358.
16. Iwagami S., Baba Y., Watanabe M., Shigaki H., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M., Sakamaki K., Ohashi Y., Baba H. (2013) Ann. Surgery, **257**(3), 449-455.
17. Baba Y., Watanabe M., Murata A., Shigaki H., Miyake K., Ishimoto T., Iwatsuki M., Iwagami S., Yoshida N., Oki E., Sakamaki K., Nakao M., Baba H. (2014) Clin. Cancer Res., **20**(5), 1114-1124.
18. Zhu J., Ling Y., Xu Y., Lu M.Z., Liu Y.P., Zhang C.S. (2015) Int. J. Clin. Exp. Pathol., **8**(11), 14392-14400.
19. Kaz A.M., Wong C.J., Luo Y., Virgin J.B., Washington M.K., Willis J.E., Leidner R.S., Chak A., Grady W.M. (2011) Epigenetics, **6**, 1403-1412.
20. Agarwal R., Jin Z., Yang J., Mori Y., Song J.H., Kumar S., Sato M., Cheng Y., Abraham J.M., Verma A., Meltzer S.J. (2012) Endocr. Relat. Cancer, **19**(1), L5-L9.
21. Alvarez H., Opalinska J., Zhou L., Sohal D., Fazzari M.J., Yu Y., Montagna C., Montgomery E.A., Canto M., Dunbar K.B. et al. (2011) PLoS Genet., **7**. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001356.
22. Wu W., Bhagat T.D., Yang X., Song J.H., Cheng Y., Agarwal R., Abraham J.M., Ibrahim S., Bartenstein M., Hussain Z., Suzuki M., Yu Y., Chen W., Eng C., Greally J., Verma A., Meltzer S.J. (2013) Gastroenterology, **144**(5), 956-966.
23. Krause L., Nones K., Löffler K.A., Nancarrow D., Oey H., Tang Y.H., Wayte N.J., Patch A.M., Patel K., Brosda S. et al. (2016) Carcinogenesis, bgw018v2-bgw018.
24. Kishino T., Niwa T., Yamashita S., Takahashi T., Nakazato H., Nakajima T., Igaki H., Tachimori Y., Suzuki Y., Ushijima T. (2016) Mol. Carcinog. J., **12**, DOI: 10.1002/mc.22452.
25. Devriese L.A., Voest E.E., Beijnen J.H., Schellens J.H. (2011) Cancer Treat. Rev., **37**, 579-589.
26. Hoffmann A.C., Vallbohmer D., Prenzel K., Metzger R., Heitmann M., Neiss S., Ling F., Hölscher A.H., Schneider P.M., Brabender J. (2009) J. Cancer Res. Clin. Oncol., **135**, 1231-1237.

27. Zhai R., Zhao Y., Su L., Cassidy L., Liu G., Christiani D.C. (2012) *Neoplasia*, **14**, 29-33.
28. Findlay J.M., Middleton M.R., Tomlinson I.A. (2015) *Ann. Oncol.*, **26**, 624-644.
29. Almhanna K., Meredith K.L., Hoffe S.E., Shridhar R., Coppola D. (2013) *Cancer Control.*, **20**(2), 111-116.
30. Guo M., Ren J., House M.G., Qi Y., Brock M.V., Herman J.G. (2006) *Clin. Cancer Res.*, **12**, 4515-4522.
31. Kuester D., El-Rifai W., Peng D., Ruemmele P., Kroeckel I., Peters B., Moskaluk C.A., Stolte M., Mönkemüller K., Meyer F., Schulz H.U., Hartmann A., Roessner A., Schneider-Stock R. (2009) *Cancer Lett.*, **275**, 117-126.
32. Anupam K., Tusharkant C., Gupta S.D., Ranju R. (2006) *World. J. Gastroenterol.*, **12**, 6041-6045.
33. Tischoff I., Hengge U.R., Vieth M., Ell C., Stolte M., Weber A., Schmidt W.E., Tannapfel A. (2007) *Gut*, **56**, 1047-1053.
34. Zhang M., Linghu E., Zhan Q., He T., Cao B., Brock M.V., Herman J.G., Xiang R., Guo M. (2016) *Oncotarget.*, DOI: 10.18632/oncotarget.7647.

Поступила: 22. 03. 2016.
Принята к печати: 22. 09. 2016.

EPIGENETIC MARKERS OF ESOPHAGEAL CANCER: DNA METHYLATION

O.I. Kit, D.I. Vodolazhskiy, E.N. Kolesnikov, N.N. Timoshkina

Rostov Cancer Research Institute,
63, 14th Line str., Rostov-on-Don, 344037 Russia; e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Adenocarcinoma and squamous cell carcinoma are the most common types of esophageal cancer with a constant tendency to increase the incidence of growth on the background of the high mortality, which makes particularly the development of new biomarkers that complement and improve the early diagnosis of this disease. Despite the impressive number of studies in routine clinical practice is used only marker of esophageal cancer – ERBB2/HER2 status. This review summarizes data on the identified epigenetic markers of the aberrant methylation of the genome, which may be useful for early detection of esophageal cancer, prognosis estimation and / or prediction of response to treatment. The development of new high-tech genome-wide screening, such as beadarray and immunoprecipitation sequencing method used for the wideband genotyping, but for the analysis of transcriptome and metilom, provides a comprehensive picture of genetic and epigenetic changes during tumorigenesis. Note the need to verify the most biomarkers on large representative samples for the development of valid diagnostic panels, suitable for large-scale screening of risk groups.

Key words: adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus, DNA methylation, biomarkers