



# Вестник

ВОЛГОГРАДСКОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО  
МЕДИЦИНСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА

**ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ**

**Главный редактор**

В. И. Петров, академик РАМН

**Зам. главного редактора**

М. Е. Стаценко, профессор

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ**

А. Р. Бабаева, профессор

А. Г. Бебуришвили, профессор

А. А. Воробьев, профессор

С. В. Дмитриенко, профессор

В. В. Жура, доцент

М. Ю. Капитонова, профессор  
(научный редактор)

С. В. Клаучек, профессор

Н. И. Латышевская, профессор

В. Б. Мандриков, профессор

И. А. Петрова, профессор

В. И. Сабанов, профессор

Л. В. Ткаченко, профессор

С. В. Туркина (ответственный  
секретарь)

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ**

А. Б. Зборовский, академик РАМН  
(Волгоград)

Н. Н. Седова, профессор  
(Волгоград)

А. А. Спасов, чл.-кор. РАМН  
(Волгоград)

В. П. Туманов, профессор  
(Москва)

А. К. Косоуров, профессор  
(Санкт-Петербург)

Г. П. Котельников, академик РАМН  
(Самара)

П. В. Глыбочко, чл.-кор. РАМН  
(Саратов)

В. А. Батурин, профессор  
(Ставрополь)

**2 (30)**

**АПРЕЛЬ-  
ИЮНЬ  
2009**



VOX  
AUDITA LAETET,  
LITTERA SCRIPTA  
MANET

ИЗДАТЕЛЬСТВО  
ВОЛГМУ

ISSN 1994-9480



9 771994 948340 >

---

---

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

---

УДК 577.21:616.006

## АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАННОГО СТАТУСА ГЕНОВ: RASSF1A, BRCA1, HIN1 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ

*А. А. Потапова\*, О. В. Островский, Г. П. Дудченко*

*Кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии ВолГМУ,  
Филадельфийский онкологический центр\**

Некоторые гены супрессоры опухолевого роста могут быть гиперметилированными при многих новообразованиях, таких как опухоли молочной железы и яичников, но неметилированными в нормальных клетках.

С помощью бисульфитной последовательности проведен анализ метилирования следующих генов супрессоров опухолевого роста: RASSF1A, BRCA1 и HIN1. Для этого изучалась геномная ДНК из пяти различных клеточных линий опухолей молочной железы (MDA231, MDA435, MCF7, T47D, HS-578T) и яичников (A2780, SKOV3, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3), а также нормальной ткани.

Было обнаружено, что промотерные участки генов RASSF1A и HIN1 гиперметилированы в некоторых клеточных линиях обоих типов опухоли. В то же время проморенная область гена BRCA1 была неметилирована во всех исследованных клеточных линиях опухолей.

*Ключевые слова:* метилированный ген, неметилированный ген, RASSF1A, BRCA1, HIN1, опухоли молочной железы, опухоли яичников.

## ANALYSIS OF METHYLATION STATUS ANALYSIS OF RASSF1A, BRCA1, HIN1 IN BREAST AND OVARIAN CANCER CELL LINES

*A. A. Potapova, O. V. Ostrovskiy, G. P. Dudchenko*

Several tumor suppressor genes have been found to be hypermethylated in many tumor types, including breast and ovarian cancer but to be unmethylated in normal cells.

Here we have examined by bisulfite sequencing the methylation status of the following tumor-suppressor genes: RASSF1A, BRCA1 and HIN1. For this study we used genomic DNA from five different breast cancer cell lines (MDA231, MDA435, MCF7, T47D, HS-578T) and five different ovarian cancer cell lines (A2780, SKOV3, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3) as well as from normal tissue.

We found promoter region of RASSF1A and HIN1 to be hypermethylated in several cancer cell lines in both types of cancer. At the same time the promoter region of BRCA1 was unmethylated in all analyzed cancer cell lines.

*Key words:* methylated gene, unmethylated gene, RASSF1A, BRCA1, HIN1, breast cancer, ovarian cancer.

Развитие злокачественных новообразований традиционно связывают с генетическими аномалиями в виде мутаций в генах супрессорах опухолевого роста и онкогенах или хромосомными абберациями [6]. Вместе с тем причинами данной группы заболеваний могут быть эпигенетические изменения, в результате которых меняется профиль экспрессии генов без нарушений первичной структуры ДНК [5, 7].

Одним из таких эпигенетических изменений ДНК у млекопитающих является аномально высокий уровень метилирования цитозина в позиции С5 в CpG-сочетаниях нуклеотидов промоторной зоны генов [1]. Метилирование ДНК приводит к подавлению транс-

крипции напрямую, препятствуя взаимодействию регуляторных белков (факторов транскрипции) с промотором, и опосредованно через связывание специфических репрессоров транскрипции (метилспецифических белков) с метилированной ДНК. Доказано, что степень репрессии активности гена пропорциональна плотности метилирования цитозинов на условную единицу длины ДНК.

К настоящему времени достоверно установлена роль гиперметилирования CpG-островков промоторов генов супрессоров в онкогенезе [7]. В литературе есть сведения о целом ряде генов супрессоров опухолевого роста гиперметилированных при различных видах опу-

холой [3, 4], в том числе и при опухолях молочной железы и яичников (RARb, APC, P16) [2, 3, 8, 9], но с отсутствием метилирования этих генов в нормальных тканях.

Однако не исключено, что при новообразованиях гиперметилированию могут подвергаться и другие гены супрессоры. При отсутствии специфичности эпигенетически измененных генов супрессоров по отношению к конкретным типам опухолей выявление комбинаций уже известных аномально метилированных генов супрессоров с вновь выявленными могло бы повысить диагностическую значимость таких панелей маркеров для раннего выявления новообразований определенного типа, в том числе и опухолей молочной железы и яичников.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ статуса метилирования генов супрессоров опухолевого роста RASSF1A, BRCA1, HIN1 в клеточных линиях опухолей молочной железы и яичников.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для анализа метилированного статуса RASSF1A, BRCA1, HIN1 были использованы следующие клеточные линии: MDA231, MDA435, MCF7, T47D, HS-578T (опухолей молочной железы) и A2780, SKOV3, OVCAR10, OVCAR5, OVCAR3 (опухолей яичников). В качестве отрицательного контроля использовалась ДНК, выделенная из тканей молочной железы и поверхностного (внешнего) эпителия яичников, а также ДНК лимфоцитов крови здоровых людей.

Выделение ДНК проводили методом лизиса клеток при помощи протеиназы К в присутствии 10%-го раствора SDS, с последующей ее экстракцией смесью фенол/хлороформа (1:1) и преципитацией спиртом.

Оценку статуса метилирования индивидуальных CpG-островков промоторной зоны генов RASSF1A, BRCA1, HIN1 ДНК проводили, используя метод метилспецифической полимеразной цепной реакции (ПЦР) урацил заменяется на тимин. Таким образом, оказывается возможным конструирование праймеров, избирательно амплифицирующие последовательности, содержащие или не содержащие метилированные остатки цитозина в CpG-островков.

Обработка образцов ДНК бисульфатом натрия при определенных условиях приводит к дезаминированию цитозина с образованием урацила, тогда как метилированные остатки цитозина остаются неизменными. При последующей полимеразной цепной реакции (ПЦР) урацил заменяется на тимин. Таким образом, оказывается возможным конструирование праймеров, избирательно амплифицирующие последовательности, содержащие или не содержащие метилированные остатки цитозина в CpG-островков.

Предварительно денатурированную 2М раствором NaOH в течение 10 минут при 37 °С геномную ДНК (1мкг/мкл) клеточных линий, нормальных лимфоцитов и тканей обрабатывали бисульфитным раствором натрия (рН 5,0) в комбинации с раствором гидрохинона с последующей инкубацией при 50 °С в течение 16—18 часов. Модифицированную ДНК очи-

щали на колонках с использованием набора Wizard DNA Clean-up System (Promega, Madison, WI), после чего для преципитации в течение 10 минут при комнатной температуре обрабатывали 3М раствором NaOH с последующим добавлением гликогена, 10М аммония ацетата и 100%-го этанола.

Амплификацию модифицированной ДНК проводили с использованием праймеров для промоторных участков генов RASSF1A, BRCA1, HIN1. Структура и ориентация праймеров представлены в табл. 1.

Визуализацию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2%-м агарозном геле при напряжении источника тока 100 В. Полосы ДНК, вырезанные из агарозного геля, очищали при помощи набора Qiagen (Gel Extraction Kit), после чего проводили секвенирование продуктов ПЦР на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems (Model 377XL) с использованием праймеров специфических для каждого гена (табл. 1).

Таблица 1

Секвенс праймеров, использованных для постановки ПЦР

Название праймера	Секвенс праймера (5'→3')	Ориентация
HIN1 F	GAGGGAAGTTTTTTTTTGG (20)	Forward
HIN1 R	CRAAACTACAAAACAAAACCA (20)	Reverse
RASSF1A F	GTAGAGAGGGAGAGTGTTTTAA	Forward
RASSF1A R	AATCCAACCTTATCAAAAACCTAACT	Reverse
BRCA1 F	TYGTTYGTAGTGTTAATTATGA	Forward
BRCA1 R	CCRAAATAACAAAATAAACCTT	Reverse

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было обнаружено, что ген RASSF1A метилирован во всех клеточных линиях опухолей молочной железы и в 4 клеточных линиях опухолей яичников. Промоторная область гена HIN1 оказалось метилированной для 4 клеточных линий опухолей молочной железы и всех клеточных линий опухолей яичников. При исследовании промоторной области гена BRCA1 метилирование не было обнаружено ни для одной из клеточных линий. Результаты исследования приведены в табл. 2 и отражены на рис.

Секвенс ДНК нормальных тканей, клеточных линий опухолей молочной железы и яичников для генов HIN1 и RASSF1A. Не метилированный цитозин (C) заменен на урацил (T). Присутствие цитозина (C) перед гуанином (G) в CpG-динуклеотидах обозначено стрелками и показывает метилирование данного CpG-динуклеотида в клеточных линиях опухолей молочной железы и яичников, в то же время присутствие T вместо C в той же позиции в нормальных тканях, означает отсутствие метилирования.

Наличие метилирования промоторной области генов RASSF1A и HIN1 для клеточных линий карцином молочной железы и яичников позволяет рассматривать эти гены как потенциальные маркеры опухолей молочной железы и яичников.

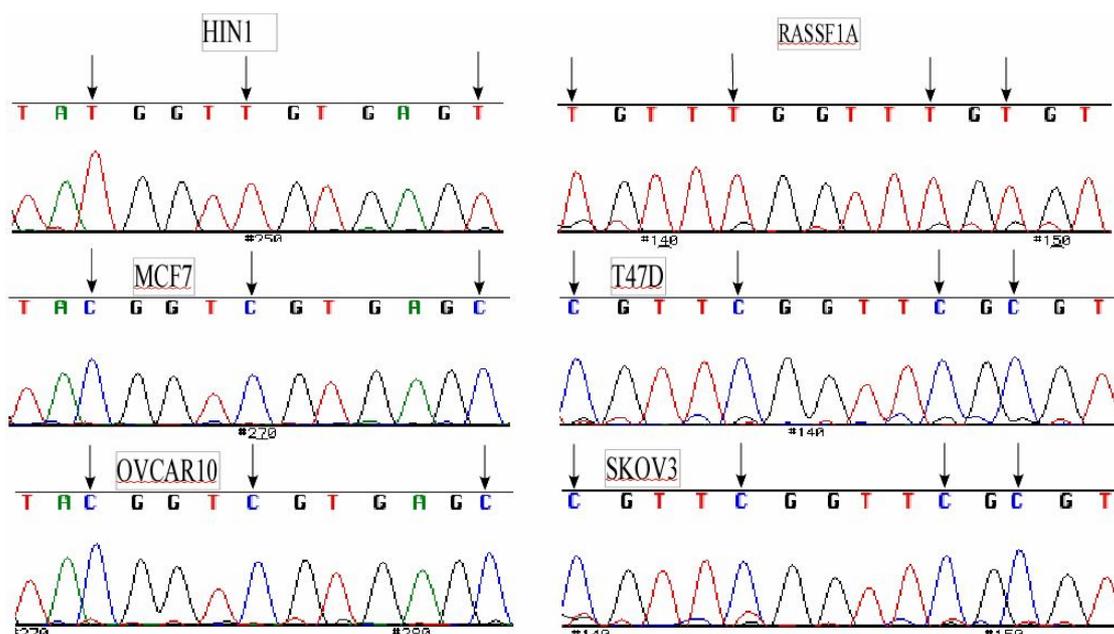


Рис. Бисульфитный секвенс промоторных областей CpG островков для генов HIN1 и RASSF1A

Таблица 2

### Статус метилирования для генов: RASSF1A, BRCA1, HIN1

Клеточные линии опухолей молочной железы	RASSF1A	HIN1	BRCA1
MDA MB 231	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
MDA MB 435	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
MCF7	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
T47D	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
HS-578T	Метилирован	Не метилирован	Не метилирован
Клеточные линии опухолей яичников			
OVCAR10	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
OVCAR5	Не метилирован	Метилирован	Не метилирован
OVCAR3	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
A2780	Метилирован	Метилирован	Не метилирован
SKOV3	Метилирован	Метилирован	Не метилирован

Несмотря на то, что промоторная область гена BRCA1 оказалась не метилирована для всех проанализированных клеточных линий, это не исключает данный ген из списка потенциальных биологических маркеров опухолей молочной железы и яичников. Во-первых, установлено, что наследственная мутация гена BRCA1 значительно повышает риск возникновения опухоли молочной железы. Кроме того, этот ген имеет важную функциональную активность. BRCA1 играет центральную роль в репарации ДНК, участвует в транскрипционной регуляции гена P21, одной из функций которого является ингибирование клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК клетки. Во-вторых, по данным литературы, известны случаи гиперметилирования промоторной зоны данного гена супрессора при различных типах рака молочной железы. В то же время клеточные линии различных типов опухолей явля-

ются удобной, но не идеальной моделью анализа статуса метилирования генов, так как большинство из них представлены наиболее распространенными видами злокачественных новообразований, и по этой причине при исследовании не представляется возможным анализ всего спектра различных типов опухолей.

Таким образом, представляется интересным перспективным продолжение исследования статуса метилирования промоторных областей генов RASSF1A, HIN1 и BRCA1 в клинических образцах опухолей молочной железы и яичников.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Bird A. // Genes. Dev. — 2001. — № 16. — P. 6—21.
2. Dammann R., Yang G., Pfeifer G. P. // Cancer Res. — 2001. — № 61. — P. 3105—3109.
3. Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G. // Cancer Res. — 2001. — № 61. — P. 3225—3229.
4. Esteller M., Sparks A., Toyota M., et al. // Cancer Res. — 2000. — № 60. — P. 4366—4371.
5. Feinberg A. P., Tycko B. // Nature Rev. — 2004. — № 4. — P. 143—153.
6. Hanahan D., Weinberg R. A. // Cell. — 2000. — № 100. — P. 57—70.
7. Herman J. G., Baylin S. B. // N. Engl. J. Med. — 2003. — № 349. — P. 2042—2054.
8. Holst C. R., Nuovo G. J., Esteller M., et al. // Cancer Res. — 2003. — № 63. — P. 159—6601.
9. Lehmann U., Langer F., Feist H., et al. // Am J. Pathol. — 2002. — № 160. — P. 605—612.

### Контактная информация

**Островский Олег Владимирович** — д. м. н., профессор, зав. каф. теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, e-mail: ol.ostr@gmail.com

# СОДЕРЖАНИЕ

## ЛЕКЦИЯ

*Петров Д. Ю., Тетерин О. Г., Маланин Д. А., Гунин К. В., Лемешкин С. С., Чернявский М. А., Макаров А. Д.*  
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ  
ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ПОПЕРЕЧНОЙ  
ДЕФОРМАЦИИ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА СТОПЫ 3

## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

*Маланин Д. А., Новочадов В. В., Самусев С. Р., Тетерин О. Г., Сучилин И. А., Жуликов А. Л.*  
ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ВОССТАНОВЛЕНИИ  
КОЛЕННОГО СУСТАВА ПРИ ЕГО ПОВРЕЖДЕНИЯХ  
И ЗАБОЛЕВАНИЯХ 7

*Сайед Камруззаман, Плутницкий А. Н., Авакян А. А., Волошина Л. В., Головина С. М.*  
КРИЗИС ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗДОРОВЬЯ И СМЕРТНОСТИ  
В РОССИИ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ЕГО ПРЕОДОЛЕНИЯ  
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 14

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Потапова А. А., Островский О. В., Дудченко Г. П.*  
АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАННОГО СТАТУСА ГЕНОВ: RASSF1A,  
BRCA1, HIN1 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ОПУХОЛЕЙ  
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКОВ 20

*Дашкова И. Р., Ирхина А. Н.*  
КОМБИНИРОВАННАЯ ПЛАСТИКА ДЕФЕКТОВ СВОДА  
ЧЕРЕПА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ МЕСТНО-  
РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ КОЖИ 23

*Кузьмина М. А., Ипатова М. В., Синчихин С. П.,  
Наврузова З. Т.*  
КУРОРТНЫЕ ФАКТОРЫ САНАТОРИЯ «ТИНАКИ»  
В ЛЕЧЕНИИ ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ 26

*Лифанова Е. В., Верстакова О. Е., Будников М. Ю.*  
ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРУЮЩЕГОСЯ  
АДДИКТИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ У ДЕТЕЙ СТАРШЕГО  
ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА 30

*Мандриков В. Б., Гавриков К. В., Клаучек С. В.,  
Воробьев А. А., Перепелкин А. И.*  
ВЛИЯНИЕ ПОЛА И КОНСТИТУЦИИ НА РАЗВИТИЕ  
ПАТОЛОГИИ СТОПЫ У СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА 33

*Овсейчик М. Ю., Попова И. С.*  
ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ  
ИНОРОДНЫХ ТЕЛ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА 36

*Половодова Н. С., Мальцева Т. В.*  
ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПОДРОСТКОВ  
ЯМАЛЬСКОГО РЕГИОНА С РАЗЛИЧНОЙ  
НАПРАВЛЕННОСТЬЮ ВЕГЕТАТИВНОГО ТОНУСА 39

*Тонконоженко Н. Л., Клиточенко Г. В.*  
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ  
МЕТОДИК РЕЛАКСАЦИИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ  
ОБРАТНОЙ СВЯЗИ ПРИ КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА  
ГИПЕРАКТИВНОСТИ С ДЕФИЦИТОМ ВНИМАНИЯ 43

*Топчиев М. А., Завьялов Д. Н., Жидовинов А. А.,  
Антонян В. В.*  
МОНИТОРИНГ, ПРОГНОЗ И НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ 45

## LECTURE

*Petrov D. Yu., Teterin O. G., Malanin D. A., Gunin K. V., Lemeshkin S.S., Chernyavsky M. A., Makarov A. D.*  
UP-TO-DATE INFORMATION ON THE ISSUE  
OF SURGICAL TREATMENT OF FOREFOOT  
DEFORMATION 3

## SURVEYS

*Malanin D. A., Novochadov V. V., Samusev S. R., Teterin O. G., Suchilin I. A., Julikov A. L.*  
INNOVATIVE TECHNOLOGIES  
IN RESTORATION OF DAMAGED  
OR DISEASED KNEE JOINT 7

*Kamruzzaman S., Plutnitskiy A. N., Avakjan A. A., Voloshina L. V., Golovina S. M.*  
CRISIS OF HEALTH AND MORTALITY INDICES IN RUSSIA  
AND POSSIBLE WAYS OF OVERCOMING IT  
(SURVEY) 14

## ORIGINAL PAPER

*Potapova A. A., Ostrovskiy O. V., Dudchenko G. P.*  
ANALYSIS OF METHYLATION STATUS OF RASSF1A, BRCA1,  
HIN1 IN BREAST  
AND OVARIAN CANCER CELL LINES 20

*Dashkova I. R., Irkhina A. N.*  
COMBINED PLASTY OF DEFECTS OF CRANIAL VAULT IN  
COMPLEX TREATMENT OF PATIENTS WITH LOCALLY-  
ADVANCED SKIN CANCER 23

*Kuzmina M. A., Ipatova M. V., Sinchikhin S. P.,  
Navruzova Z. T.*  
HEALTH-RESORT FACTORS OF THE TINAKI REHABILITATION  
CENTE IN THE TREATMENT OF GYNECOLOGIC PATIENTS 26

*Lifanova E. V., Verstakova O. E., Budnikov M. Yu.*  
INVESTIGATION OF DEVELOPMENT OF ADDICTIVE  
BEHAVIOUR IN SENIOR  
HIGH SCHOOL ADOLESCENTS 30

*Mandrikov V. B., Gavrikov K. V., Klauchek S. V.,  
Vorobiev A. A., Perepelkin A. I.*  
EFFECT OF SEX AND CONSTITUTION  
ON DEVELOPMENT OF FOOT DISEASES  
IN MEDICAL STUDENTS 33

*Ovseichik M. Yu., Popova I. S.*  
ERRORS AND COMPLICATIONS IN DIAGNOSTICS AND  
TREATMENT OF FOREIGN BODIES IN THE ALIMENTARY TRACT 36

*Polovodova N. S., Maltseva T. V.*  
SPECIFICS OF IMMUNE STATUS IN TENAGERS  
WITH DIFFERENT VEGETATIVE TONUS DIRECTIONS  
IN YAMAL REGION 39

*Tonkonozhenko N. L., Klitochenko G. V.*  
COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF TRADITIONAL  
RELAXATION AND BIOLOGICAL FEEDBACK METHODS  
IN TREATMENT OF ATTENTION-DEFICIT  
HYPERACTIVITY DISORDER 43

*Topchiev M. A., Zavyalov D. N., Jidovinov A. A.,  
Antonyan V. V.*  
MONITORING, PROGNOSIS AND NEW TECHNOLOGY IN  
SURGICAL TREATMENT OF ULCER DISEASE 45