УДК: 616.345-006.5:577.21:575.113

МЕТИЛИРОВАНИЕ CDKN2A ГЕНА ПРИ ЕДИНИЧНЫХ И МНОЖЕСТВЕННЫХ ПОЛИПАХ ТОЛСТОЙ КИШКИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исламов Х.Дж., Тен Я.В.

YO‘G‘ON ICHAKNING YAKKA VA KO‘P SONLI POLIPLARIDA CDKN2A GENI METILLANISHI: PILOT TADQIQOT

Islomov H.J., Ten Y.V.

CDKN2A GENE METHYLATION IN SOLITARY AND MULTIPLE COLORECTAL POLYPS: A PILOT STUDY

Islamov H.J., Ten Y.V.

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии

Maqsad: *yo’g’on ichak poliplari va polipozi bo’lgan bemorlarda yo’g’on ichak saratonini erta tashxislashning potentsial usuli sifatida CDKN2A promotor metilatsiyasini baholash.* ***Materiallar va usullar:*** *tadqiqotga 45 bemor kiritilgan. Asosiy guruhga yakka va ko’p yo’g’on ichak poliplari bo’lgan 30 bemor kiritilgan bo’lib, ularda standart tekshirish usullaridan tashqari metillangan CDKN-2A geni aniqlangan. Nazorat guruhiga CDKN-2A genining metilatsiyasi ham aniqlangan 15 nafar sog’lom shaxs kiritilgan. Barcha ishtirokchilar standartlashtirilgan diagnostika tekshiruvidan o’tdilar, jumladan, to’liq qon tahlili va biokimyo, ko’krak qafasi rentgenografiyasi, qorin bo’shlig’i ultratovush tekshiruvi, bariy klizmasi, biopsiya bilan rektoskopiya yoki kolonoskopiya, qorin bo’shlig’i kompyuter tomografiyasi va biopsiya materialining gistopatologik tekshiruvi.* ***Natijalar:*** *CDKN2A metilatsiyasi bemorlarning 46,7% (14/30) da aniqlangan. Ko’p/diffuz polipozi bo’lgan bemorlar orasida 11/15 (80,0%) da ijobiy natija olingan.* ***Xulosa:*** *CDKN2A metillanishi keng tarqalgan bo’lib, asosan ko’p/diffuz polipozli bemorlarda kuzatilgan.*

Kalit so’zlar: *yo’g’on ichak saratoni, CDKN2A genining metillanishi, erta tashxis.*

Objective: *To evaluate CDKN2A promoter methylation as a potential method for early diagnosis of colorectal cancer in patients with colon polyps and polyposis.* ***Material and methods:*** *The study included 45 patients. The main group included 30 patients with solitary and multiple colon polyps, in whom, in addition to standard examination methods, the methylated CDKN-2A gene was determined. The control group consisted of 15 potentially healthy individuals in whom methylation of the CDKN-2A gene was also determined. All participants underwent a standardized diagnostic examination, including a complete blood count and biochemistry, chest X-ray, abdominal ultrasound, barium enema, rectoscopy or colonoscopy with biopsy, abdominal computed tomography, and histopathological examination of biopsy material.* ***Results:*** *CDKN2A methylation was detected in 46.7% (14/30) of patients. Among patients with multiple/diffuse polyposis, a positive result was obtained in 11/15 (80.0%).* ***Conclusions:*** *CDKN2A methylation was common, occurring primarily in patients with multiple/diffuse polyposis.*

Key words: *colorectal cancer, CDKN2A gene methylation, early diagnosis.*

Согласно данным GLOBOCAN 2022, наиболее часто диагностируемыми видами рака в мире являются рак легких (15,2%), рак молочной железы (12,4%) и колоректальный рак (10,4%) [7]. Согласно данным государственной отчетной формы, ситуация в Узбекистане аналогична: на рак молочной железы приходится 17,2% из всех впервые зарегистрированных злокачественных новообразований, за ним следуют колоректальный рак (7,9%) и рак желудка (7,2%). У мужчин наиболее распространенными видами злокачественных новообразований являются рак желудка (11,8%), рак легких (10,7%) и колоректальный рак (9,9%) [9]. Эти тенденции подчеркивают неуклонно растущее глобальное и региональное бремя колоректального рака и указывают на необходимость улучшения стратегий по ранней диагностике заболевания.

Полипы и полипоз желудочно-кишечного тракта представляют собой клинически значимую группу состояний, связанных с высоким риском злокачественной трансформации, рецидива и послеоперационных осложнений. Неблагоприятные исходы часто являются результатом поздней диагностики и ограниченной эффективности хирургического лечения на поздних стадиях заболевания [3]. Диагностические трудности возникают из-за гетерогенности клинических проявлений, минимальных или отсутствующих симптомов на ранних стадиях развития и недостаточной чувствительности традиционных диагностических инструментов. В результате прогрессирование до инвазивной или генерализованной злокачественной опухоли отмечается у 60-70% пациентов в течение длительного периода наблюдения [7,8].

Согласно классическому морфологическому определению, истинный полип представляет собой выпячивание слизистой оболочки, состоящее из пролиферирующего железистого эпителия с трубчатой или ворсинчатой структурой, поддерживаемого соединительнотканным ядром, содержащим гладкомышечные волокна [2]. Диффузный полипоз толстой кишки характеризуется сотнями или тысячами полипов, распределенных по всей толстой кишке, и связан с высокой частотой моно- или мультицентрической злокачественности. Эндоскопическая резекция крупных сидячих или широких полипов может быть технически сложной и сопряжена с высоким риском кровотечения и перфорации [2,5].

Эпидемиологические исследования показывают, что примерно у 10% людей старше 45 лет развиваются полипы толстой кишки, почти у 1% из них происходит прогрессирование до колоректального рака [6]. Последовательность аденома-карцинома хорошо изучена, подтверждая, что аденоматозные полипы представляют собой предраковые поражения для колоректальной аденокарциномы [6,12]. Поэтому выявление биомаркеров, способных обна-

руживать злокачественную трансформацию на ранних стадиях, является приоритетной задачей в современной онкологии [1].

Эпигенетическая дисрегуляция, в частности аберрантное гиперметилирование промоторных областей генов-супрессоров опухолей, считается одним из самых ранних молекулярных событий в колоректальном канцерогенезе [4,5]. CDKN2A (p16), ключевой регулятор остановки G1-фазы, часто инактивируется из-за гиперметилирования промотора, обеспечивая механистическую связь с неконтролируемой пролиферацией клеток [7,8,11]. Эти данные позволяют предположить, что метилирование CDKN2A может служить перспективным биомаркером ранней диагностики и прогнозирования у пациентов с кишечными полипами.

Инактивация генов в процессе канцерогенеза может происходить посредством структурных мутаций, делеций или эпигенетического подавления через гиперметилирование CpG-островков [1,8]. Поскольку колоректальный рак развивается в результате многоступенчатого процесса, включающего множество молекулярных путей, анализ паттернов метилирования ДНК имеет существенное теоретическое и клиническое значение [6,12]. С клинической точки зрения обнаружение аберрантного метилирования может повысить диагностическую чувствительность, выявить поражения высокого риска и направлять индивидуальное наблюдение после полипэктомии [10,12].

В физиологических условиях метилирование ДНК регулирует экспрессию генов, структуру хроматина, дифференцировку, геномный импринтинг и геномную стабильность. Глобальное гипометилирование может активировать онкогены и способствовать хромосомной нестабильности, тогда как гиперметилирование промотора приводит к транскрипционному подавлению генов-супрессоров опухоли [7,8,12]. Гиперметилирование генов, регулирующих клеточный цикл, таких как RB1, CDKN2A/p16, CDKN2B/p15 и p14/ARF, было описано в нескольких типах опухолей [9,10]. Специфические для опухолей сигнатуры метилирования, включающие CDH1, ER и CALCA, связаны с агрессивностью заболевания и метастатическим потенциалом [11].

В совокупности эти данные позволяют предположить, что гиперметилирование промотора CDKN2A может служить ранним биомаркером злокачественной трансформации у пациентов с полипами и полипозом толстой кишки, обеспечивая молекулярную основу для точной ранней диагностики и стратегий профилактики рака.

Цель исследования

Оценка метилирования промотора CDKN2A как потенциального метода ранней диагностики колоректального рака у пациентов с полипами и полипозом толстой кишки.

Материал и методы

В исследование были включены 45 пациентов. В основную группу вошли 30 пациентов с одиночными и множественными полипами толстой кишки, у которых, кроме стандартных методов обследования, определяли метиллированный ген CDKN-2A. Контрольную группу составили 15 потенциально здоровых лиц, у которых также поводилось метиллирование гена CDKN-2A. Все участники прошли стандартизированное диагностическое обследование, включающее общий и, биохимический анализ крови, рентгенографию грудной клетки, ультразвуковое исследование брюшной полости, ирригоскопию, ректоскопию или колоноскопию с биопсией, компьютерную томографию брюшной полости и гистопатологическое исследование биопсийного материала.

Ни у одного из участников не было в анамнезе злокачественных новообразований. После завершения диагностических процедур пациенты с ворсинчатыми и тубуловорсинчатыми полипами были отобраны для молекулярно-генетического анализа.

Молекулярно-генетический анализ: метилирование гена CDKN2A оценивалось с использованием специализированного протокола молекулярной диагностики. Все анализы проводились в биологической лаборатории Центра высоких технологий Узбекистана, оснащенной сертифицированным оборудованием для молекулярной биологии.

Подготовка образцов: образцы венозной крови центрифугировали для получения плазмы, которая служила биологическим материалом для экстракции ДНК. Кроме того, образцы биопсии массой ≥50 мг помещали в стерильные пробирки Эппендорф с ≥500 мкл физиологического раствора. Экстракцию ДНК проводили с использованием коммерческого набора DNA-Extran-2 в соответствии с протоколом производителя для тканей человека и животных.

Бисульфитная конверсия и метилспецифическая ПЦР: бисульфитную модификацию геномной ДНК проводили с использованием набора EZ DNA Methylation Kit. Затем проводили метилспецифическую полимеразную цепную реакцию с использованием набора R-412 Real-Time PCR kit. Для амплификации использовали специфические олигонуклеотидные праймеры и готовые к применению реакционные смеси, содержащие ингибированные дезоксинуклеотидтрифосфаты «горячего старта», хлорид магния и оптимизированный ПЦР-буфер.

Детектирование продуктов ПЦР: амплифицированные продукты анализировали методом электрофореза в агарозном геле и визуализировали под ультрафиолетовым освещением. Результаты регистрировались и интерпретировались с использованием стандартного лабораторного программного обеспечения.

Клиническое ведение на основе статуса метилирования: пациенты с положительным результатом метилирования промотора CDKN2A были отнесены к группе высокого риска злокачественной трансформации и направлены на хирургическое лечение. Пациенты с отрицательными результатами метилирования были направлены на амбулаторное наблюдение с динамическим контролем.

Результаты исследования

В исследование были включены 45 человек. Основную группу составили 30 пациентов с полипами или полипозом толстой кишки. Контрольная

группа: 15 потенциально здоровые лица. Возраст пациентов варьировал от 32 до 75 лет (средний возраст 49,2±3,3 года). Мужчин было 14 (46,7%), женщин 16 (53,3%).

Все пациенты прошли стандартные диагностические процедуры, включая колоноскопию с биопсией, ирригографию, КТ-исследование и морфологическую верификацию. Клинические, морфологические и молекулярные показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1

Клинические, морфологические и молекулярно-генетические параметры у пациентов с полипами и полипозом толстой кишки

Показатель	Число больных, абс. (%)
Возраст, лет: - до 30 - старше 30	 4 (13,3) 26 (86,7)
Пол: - жен. - муж.	 16 (53,3) 14 (46,7)
Кол-во полипов: - единичные - множественные - диффузные	 15 (50,0) 5 (16,7) 10 (33,3)
Гистологические варианты: - аденоматозные - ворсинчатые	 22 (73,3) 8 (26,7)
Метилирование CDKN2A гена: - положительное - отрицательное	 14 (46,7) 16 (53,3)
Лечение: - наблюдение - эндоскопическое удаление - другие виды хирургических вмешательств	 9 (30) 5 (16,7) 16 (53,3)

В ходе обследования у 15 (50,0%) пациентов были обнаружены единичные полипы, у 5 (16,7%) – множественные полипы, у 10 (33,3%) – полипоз. Гистологическое исследование биопсийного материала аденоматозные полипы выявило у 22 (73,3%) больных, ворсинчатые полипы у 8 (26,7%). У 1 (3,3%) пациента после операции гистологически был диагностирован «рак in situ».

Метилирование специфической ПЦР выявило метилирование промотора CDKN2A у 14 (46,7%) из 30 пациентов основной группы. Метилирование CDKN2A отсутствовало у 100% здоровых контрольных лиц.

Статистическое сравнение с использованием критерия χ^2 продемонстрировало значимую связь между метилированием CDKN2A и неопластическими полипами ($p<0,01$). Наличие метилирования у пациентов с множественным или диффузным полипозом было значительно выше, чем у больных с единичным поражением. Эта разница была статистически значимой ($p<0,001$), что подтверждает корреляцию между метилированием и множественностью поражений толстой кишки.

Количество случаев с положительным результатом метилирования при множественном/диффузном полипозе толстого кишечника значительно больше, чем единичных полипах (соответственно 13,3 и 80,0%). Это указывает на то, что метилирование промотора CDKN2A надежно дифференцирует полипоз высокого риска от изолированных поражений низкого риска (табл. 2).

Для оценки диагностической эффективности был проведен ROC-анализ, сравнивающий основную и контрольную группы. Метилирование CDKN2A продемонстрировало чувствительность: 80,0%, специфичность: 93,3%, положительную прогностическую ценность: 92,3%, отрицательную прогностическую ценность: 81,2%, площадь под ROC-кривой (AUC): 0,89. Эти показатели свидетельствуют о высокой диагностической точности и клинической полезности теста (рисунок).

Образцы были протестированы на метилирование генов (метод ПЦР).

21 (70,0%) пациенту было проведено хирургическое лечение, в том числе выполнено 16 (53,3%) трансабдоминальных операций и 5 (16,7%) эндоскопических полипэктомий. Пациенты с метилирование положительным полипозом значительно чаще нуждались в колэктомии или сегментарной резекции по сравнению со случаями с метилированием отрицательным полипозом ($p=0,02$) (табл. 3).

Таблица 2

Результаты метилирования гена CDKN2A у пациентов основной группы

Гистологический вариант полипов	Число пациентов	Метилирование (+), абс. (%)
Единичные	15	2 (13,3)
Множественные/диффузные	15	12 (80,0)

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метилирование промотора CDKN2A при множественных полипах и диффузном полипозе встречается значительно чаще, чем при изолированных поражениях. Значительная разница между пациентами основной и контрольной групп подтверждает гипотезу о том, что эпигенетическое подавление CDKN2A

является ранним событием в колоректальном канцерогенезе. Статистический анализ подтверждает как клиническую, так и диагностическую ценность тестирования на метилирование CDKN2A, демонстрируя высокую чувствительность, специфичность и AUC. Важно отметить, что у здоровых людей метилирование не обнаружено, что указывает на низкий риск ложноположительных результатов. Пациенты с положительными результатами теста на метилирование чаще нуждались в хирургическом вмешательстве, что указывает на корреляцию с клинической тяжестью заболевания. Ограничениями исследования являются относительно небольшой размер выборки и короткий период наблюдения. Для подтверждения прогностической ценности и оценки долгосрочных результатов необходимы более крупные проспективные исследования.

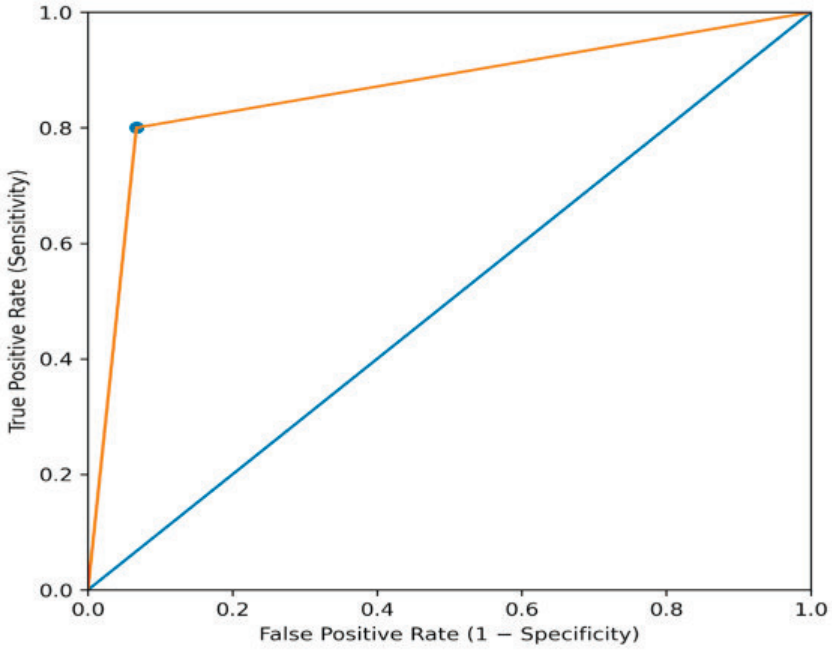


Рисунок. ROC-кривая для метилирования CDKN2A.

Таблица 3

Виды хирургических вмешательств, выполненных у больных основной группы

Вид хирургического вмешательства	Число пациентов, абс. (%)
Колэктомия с наложением илеостомы	1 (3,3)
Колэктомия, передняя резекция с анастомозом	2 (6,7)
Передняя резекция с анастомозом	5 (16,7)
Абдоминально-анальная резекция прямой кишки с наложением анастомоза	2 (6,7)
Левосторонняя гемиколэктомия с наложением стомы	4 (13,3)
Сигмоидэктомия	1 (3,3)
Трансанальное удаление полипа	2 (6,7)
Эндоскопическое удаление полипов	4 (13,3)
Всего	21 (70,0)

Выводы

1. Метилирование CDKN2A гена было обнаружено у 46,7% пациентов с полипами толстой кишки и было значительно связано с множественным/диффузным полипозом. Его отсутствие почти у всех участников контрольной группы указывает на высокую диагностическую специфичность.

2. Статистический анализ (AUC 0,89) подтверждает, что метилирование CDKN2A может служить надежным ранним молекулярным биомаркером злокачественной трансформации. Включение

тестирования на метилирование в диагностические протоколы может улучшить отбор пациентов высокого риска, оптимизировать сроки хирургического вмешательства и способствовать точной профилактике колоректального рака.

Литература

1. Draht M, Goudkade D, Koch A et al. Prognostic DNA methylation markers. Clin Epigenetics.2018;10:35.
2. El Kadmiri N. Advances in early detection of colorectal cancer: non-invasive biomarkers. Curr Drug Targets.2021;22(9):1043-53.
3. Filho AM, Laversanne M, Ferlay J et al. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. Int J Cancer.2025;156(7):1336-46.
4. Kim MS, Lee J, Sidransky D. DNA methylation markers in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev.2010;29(1):181-206.
5. Laugsand EA, Brenne SS, Skorpen F. DNA methylation markers in blood, stool, urine, and tissue. Int J Colorectal Dis.2021;36(2):239-51.
6. Li C, Liu Y, Xue D, Chan CWH. Early detection interventions. Int J Nurs Stud.2020;110:103684.
7. Matsubara N. CIMP in colorectal carcinogenesis. Gan To Kagaku Ryoho. 2010;37(9):1659-64.
8. Shima K, Nosho K, Baba Y et al. CDKN2A methylation and loss of expression. Int J Cancer.2011;128(5):1080-94.
9. Tillyashaykhov MN, Ibragimov ShN, Djanklich SM; editors. The state of oncological care for the population of the Republic of Uzbekistan in 2024. Tashkent: Halk Publishing House 2025:189.
10. Tonini V, Zanni M. Why is early detection of colon cancer still not possible in 2023 World J Gastroenterol. 2024;30(3):211–224.
11. Viscaino M, Torres-Bustos J, Muñoz P et al. Artificial intelligence for early CRC detection. Wld J Gastroenterol.2021;27(38):6399-414.
12. Xing X, Cai W, Shi H et al. CDKN2A hypermethylation meta-analysis. Brit J Cancer.2013;108(12):2542-8.

МЕТИЛИРОВАНИЕ CDKN2A ГЕНА ПРИ ЕДИНИЧНЫХ И МНОЖЕСТВЕННЫХ ПОЛИПАХ ТОЛСТОЙ КИШКИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Исламов Х.Дж., Тен Я.В.

Цель: *оценка метилирования промотора CDKN2A как потенциального метода ранней диагностики колоректального рака у пациентов с полипами и полипозом толстой кишки.* ***Материал и методы:*** *в исследование были включены 45 пациентов. В основную группу вошли 30 пациентов с одиночными и множественными полипами толстой кишки, у которых, кроме стандартных методов обследования, определяли метиллированный ген CDKN-2A. Контрольную группу составили 15 потенциально здоровых лиц, у которых также поводилось метилирование гена CDKN-2A. Все участники прошли стандартизированное диагностическое обследование, включающее общий и, биохимический анализ крови, рентгенографию грудной клетки, ультразвуковое исследование брюшной полости, ирригоскопию, ректоскопию или колоноскопию с биопсией, компьютерную томографию брюшной полости и гистопатологическое исследование биопсийного материала.* ***Результаты:*** *метилирование CDKN2A было выявлено у 46,7% (14/30) пациентов. Среди пациентов с множественным/диффузным полипозом положительный результат был получен у 11/15 (80,0%).* ***Выводы:*** *метилирование CDKN2A было частым явлением, встречающимся в основном при множественном/диффузном полипозе.*

Ключевые слова: *колоректальный рак, метилирование гена CDKN2A, ранняя диагностика.*

Сведения об авторах

Исламов Хуршид Джамшидович, к.м.н., врач-онколог РСНПМЦОиР. Тел: +998909978489, e-mail: islamovhursid.uz@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-9970-1936

Тен Яков Воличевич, врач-онколог РСНПМЦОиР. Тел: +998979008557, e-mail: tenskiy06@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-9970-1936