

Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии

И.Ф. Кустова¹, А.С. Макарова¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Инна Феликсовна Кустова innaku74@gmail.com

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — самый распространенный тип рака печени, диагностируемый в основном на поздних стадиях. Применяемые в настоящее время в клинической практике молекулярные маркеры этого заболевания имеют недостаточную чувствительность для эффективной диагностики ГК, в связи с чем ведется активный поиск новых биомаркеров. Использование малоинвазивного метода жидкостной биопсии позволяет детектировать в биологических жидкостях пациентов специфические маркеры опухолевого роста, в частности характерное для ГК нарушение паттерна метилирования генов в ДНК, циркулирующей в крови. В настоящем обзоре рассмотрены наиболее перспективные для диагностики и прогноза биомаркеры метилирования, определяемые в циркулирующей ДНК крови пациентов с ГК.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома, жидкостная биопсия, биомаркер метилирования

Для цитирования: Кустова И.Ф., Макарова А.С., Лазаревич Н.Л. Потенциал использования биомаркеров метилирования для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы методом жидкостной биопсии. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):8–19.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-8-19

Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy

I.F. Kustova¹, A.S. Makarova¹, N.L. Lazarevich^{1,2}

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Biological Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Build. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common types of liver cancer that is mainly diagnosed at advanced stages. Since molecular markers that are currently used in clinical practice are not sensitive enough for effective diagnosis of HCC, active search of new biomarkers is underway. Use of minimally invasive liquid biopsy allows to detect specific markers of tumor growth and particularly alterations of gene methylation patterns in cell-free DNA distinctive for HCC, in biological liquids of patients. In the present review the most promising diagnostic and prognostic methylation biomarkers that were detected in cell-free DNA of HCC patients are being considered.

Key words: hepatocellular carcinoma, liquid biopsy, methylation biomarker

For citation: Kustova I.F., Makarova A.S., Lazarevich N.L. Potential of the use of methylation biomarkers for diagnostics and prognosis of hepatocellular carcinoma in liquid biopsy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):8–19.

Введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — эпителиальная опухоль, возникающая из зрелых гепатоцитов или стволовых клеток печени, является самой частой формой злокачественных опухолей печени. По данным Всемирной организации здравоохранения по состоянию на 2018 г., ГК занимает 6-е место в мире по распространенности и 2-е место по уровню смертности от онкологических заболеваний со значительным преобладанием в странах Восточной, Юго-Восточной

Азии и Северной Африки [1]. Ежегодно в мире фиксируется 600–800 тыс. новых случаев данного заболевания и примерно столько же смертельных исходов [1]. В России ежегодно диагностируется около 5 тыс. новых случаев ГК, причем динамика повышения заболеваемости непрерывно растет и составляет по разным оценкам от 18 до 34 % за 10 лет [2]. Пятилетняя выживаемость пациентов с ГК не превышает 15 %. Высокая смертность и низкая эффективность лечения ГК определяются поздними сроками выявления заболевания

и устойчивостью к химиотерапии [3]. Риск развития ГК значительно повышен у лиц, инфицированных вирусами гепатита В (HBV) или С (HCV), систематически злоупотребляющих алкоголем, страдающих метаболическим синдромом и некоторыми наследственными генетическими заболеваниями (гемохроматоз, дефицит α -1-антитрипсина и др.) [4].

При дифференциальной диагностике ГК наряду с инструментальными методами исследования (ультразвуковое исследование, или компьютерная томография, или магнитно-компьютерная томография с контрастированием), позволяющими оценить морфологию патологического образования, используется определение уровня онкомаркера α -фетопротеина (АФП) в сыворотке крови. АФП синтезируется в клетках гепатоцитарного ряда в эмбриональной печени и при канцерогенезе [5]. Для АФП, единственного диагностического маркера ГК, одобренного для клинического использования, характерна высокая (80–94 %) специфичность, но недостаточная (41–65 %) чувствительность [6]. Таким образом, поиск дополнительных маркеров для диагностики ГК остается актуальной проблемой современной онкологии.

Наиболее эффективными методами лечения ГК являются хирургическая резекция, радиочастотная абляция или трансплантация; на неоперабельных стадиях возможно лечение мультикиназами ингибиторами (сорафениб, регорафениб), эффективное лишь для небольшой части больных. Надежных прогностических маркеров, которые бы способствовали выбору оптимальных схем терапии ГК или обеспечивали эффективный мониторинг течения заболевания, пока не предложено [4].

Значительный прорыв в этом направлении может быть достигнут благодаря развитию малоинвазивных методов жидкостной биопсии, которые позволяют определять в биологических жидкостях организма (плазма/сыворотка крови, моча и др.) циркулирующие опухолевые клетки (цОК), фрагменты геномной ДНК, разные типы внеклеточных РНК, экзосомы и другие микрочастицы, содержащие элементы нормальных и опухолевых клеток организма. Поскольку время жизни свободно циркулирующих биомаркеров невелико (от нескольких минут до нескольких часов), наличие или отсутствие этих молекул в крови отражает актуальное состояние пациента на момент взятия материала. Жидкостная биопсия, направленная на обнаружение или количественный анализ в биологических жидкостях специфических биомаркеров опухолевого роста, может использоваться как для ранней диагностики, так и при прогнозировании течения заболевания (появление рецидивов и метастазов) или мониторинге результатов лечения и выборе оптимальных для конкретного пациента схем лекарственной терапии. К несомненным преимуществам этого подхода относятся возможность получения материала для исследования без проведения операции или биопсии,

динамическое наблюдение состояния пациента, нивелирование эффекта внутриопухолевой гетерогенности [7–9].

В этом обзоре мы рассмотрим возможности применения жидкостной биопсии для поиска специфических биомаркеров ГК.

Циркулирующие опухолевые клетки

Впервые цОК в крови пациента с метастатической опухолью были описаны Эшвордом в 1869 г. как клетки, фенотипически похожие на клетки первичной опухоли. Пул цОК очень невысок – 1–10 клеток на миллион клеток крови у пациентов с метастатическими опухолями. На сегодняшний день разработаны системы (CellSearch, CTC-Chip и др.), позволяющие выделять цОК из небольшого объема сыворотки крови. Обогащенная фракция цОК может быть исследована с помощью методов гибридизации *in situ*, проточной цитометрии, секвенирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [10, 11].

Результаты метаанализа 23 исследований показывают, что присутствие цОК в крови больных ГК ассоциировано с худшей общей и безрецидивной выживаемостью, более высокой стадией по классификации TNM, наличием сосудистой инвазии и большим размером опухоли [12].

Циркулирующие опухолевые нуклеиновые кислоты

Свободные нуклеиновые кислоты, циркулирующие в сыворотке/плазме крови, включают сильно фрагментированную (около 160 п.н.) геномную циркулирующую ДНК (ц-ДНК), циркулирующие матричные РНК (ц-мРНК) и циркулирующие микроРНК, которые попадают в кровоток из живых, апоптотических или некротических клеток. Впервые нуклеиновые кислоты, циркулирующие в крови, были описаны в 1948 г. [13], но только спустя 50 лет, после того как в сыворотке крови больных лейкемией и раком поджелудочной железы были выявлены мутантные последовательности генов семейства *RAS*, циркулирующие опухолевые ДНК стали рассматриваться как потенциальные опухолевые биомаркеры [14, 15].

Циркулирующие опухолевые РНК. Несмотря на то, что фракция ц-мРНК в периферической крови достаточно быстро разрушается под действием рибонуклеаз, многие исследователи подтверждают стабильное присутствие ц-мРНК опухолевого происхождения в сыворотке крови пациентов с меланомой, опухолями молочной железы, толстой кишки и предстательной железы. Вероятно, ц-мРНК преимущественно упакованы в экзосомы и микровезикулы, что спасает их от разрушения в кровяном русле. По данным различных исследовательских групп, в крови пациентов с ГК циркулирующие опухолевые мРНК выявляются на очень низком уровне [10, 11].

Циркулирующие опухолевые микроРНК. Наиболее изученным классом циркулирующих опухолевых РНК

на сегодняшний день являются некодирующие циркулирующие опухолевые РНК, в частности циркулирующие опухолевые микроРНК. В отличие от циркулирующих опухолевых ДНК и циркулирующих опухолевых мРНК, количество циркулирующих опухолевых микроРНК, определяемых в крови, значительно выше. МикроРНК — класс высококонсервативных некодирующих одноцепочечных молекул РНК размером 20–25 нуклеотидов. Они вовлечены в регуляцию множества клеточных процессов — дифференцировки, апоптоза, пролиферации, а также могут выполнять онкогенные или онкосупрессорные функции. В крови эндогенные микроРНК находятся в связанном с белками или липопротеинами состоянии, что повышает их стабильность. Изучение профилей экспрессии микроРНК в разных типах опухолей выявило тканевую специфичность экспрессии микроРНК, а также корреляцию уровня их экспрессии с диагнозом, TNM-стадией и прогрессированием заболевания [10].

К настоящему времени в качестве диагностических или прогностических биомаркеров предложено более 70 микроРНК, экспрессия которых изменяется в ГК. J. Zhou и соавт. предложили диагностическую панель из 7 микроРНК (микроРНК-21, -26а, -27а, -122, -223, -192, -801), позволяющую дифференцировать ГК от случаев гепатита В и цирроза печени, при использовании жидкостной биопсии [16].

Изменение уровня ряда микроРНК может найти применение в качестве фактора прогноза течения заболевания. Так, высокий уровень микроРНК-17-5р в сыворотке может быть фактором неблагоприятного прогноза для пациентов с ГК, перенесших резекцию печени, а высокая экспрессия микроРНК-122 — низкой выживаемости пациентов с опухолями, ассоциированными с инфекцией HBV. Показано, что микроРНК-224 может служить индикатором наличия остаточных опухолей при нехирургическом лечении ГК [11].

Циркулирующие опухолевые ДНК. В плазме крови здоровых доноров концентрация ц-ДНК колеблется в пределах 1–10 нг/мл, в крови онкологических больных ее содержание значительно выше и может достигать 100 нг/мл. Даже с учетом того факта, что опухолевая ДНК составляет лишь часть всей низкомолекулярной ДНК, циркулирующей в кровотоке, этого количества может быть достаточно не только для качественного, но и для количественного определения специфических для опухолевой ткани последовательностей в общем пуле ц-ДНК при жидкостной биопсии. Выделенная из плазмы крови ц-ДНК может быть исследована на наличие генетических aberrаций — точечных мутаций и полиморфизмов (SNP), микросателлитной нестабильности, потери гетерозиготности, делеций, амплификаций, а также эпигенетических изменений, характерных для опухолевой ткани.

Выявление соматических мутаций в циркулирующей ДНК

Для выявления характерных для опухолевой ткани генетических нарушений в пуле ц-ДНК используют 2 подхода — массовое параллельное секвенирование и различные варианты ПЦР, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки и может применяться в различных модификациях. Дорогостоящее высокопроизводительное секвенирование используется преимущественно в фундаментальных исследованиях, проводимых на выборках пациентов с определенным типом опухолей. Это позволяет определить большое количество мутаций, характерных для данного заболевания, выявить неизвестные ранее генетические нарушения. Метод ПЦР, более быстрый и экономичный, используется для выявления в ц-ДНК конкретного пациента ранее охарактеризованной мутации для принятия решения о тактике лечения. Так, в клинической практике уже используется определение мутации T790M в гене *EGFR* в плазме крови больных немелкоклеточным раком легкого для контроля развития резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназы 1-го и 2-го поколения. L.A. Diaz и соавт. описали появление в крови больных колоректальным раком (КРР) мутантных вариантов гена *KRAS* при развитии резистентности к таргетной анти-EGFR-терапии [17].

Гепатоцеллюлярная карцинома характеризуется крайне гетерогенным профилем генетических нарушений — в среднем экзом ГК содержит от 40 до 80 соматических мутаций. Наиболее часто при гепатоканцерогенезе выявляются мутации промоторной области гена *TERT*, гена β-катенина (*CTNNB1*) (около 25 %, чаще всего в вирус-ассоциированных ГК) и опухолевого супрессора *TP53* (25–40 %), которые в большинстве случаев являются взаимоисключающими. Среди других генов опухолевых супрессоров, мутации которых с наибольшей частотой выявляются в клинических образцах ГК: *CDKN2A*, кодирующий ингибиторы циклинзависимых киназ Cdk4 и Cdk2 — *p16INK4a* (6–17 %) и *p14ARF* (5 %), *AXIN1* (5–15 %), *AXIN2* (2–10 %), *IGFR2* (10–20 %), *KLF6* (15 %), *CASP8* (13 %), *PTEN* (5–8 %), *HNF1a* (3 %), *SMAD2* (2 %) и *SMAD4* (5 %) и др. [18].

В настоящий момент в научной литературе опубликовано несколько статей, посвященных выявлению мутаций, характерных для опухолевой ткани ГК, в ц-ДНК тех же пациентов, и продемонстрирована принципиальная возможность мониторинга течения заболевания в отдельных случаях [19]. В исследовании, опубликованном в 2018 г., проведено ультраглубокое (5500×) секвенирование образцов ц-ДНК 8 пациентов с ГК с использованием специально разработанной для ГК таргетной панели, включающей 58 генов [20]. Достоверное присутствие мутантного аллеля хотя бы одного из исследованных генов было выявлено в 4 (50 %) случаях ГК, причем все они были ассоциированы с инфекцией HBV или HCV. В 2 случаях

«диагностических» мутаций не обнаружено даже при секвенировании опухолевой ткани тех же пациентов. Это первое исследование, в котором методом жидкостной биопсии удалось идентифицировать мутацию в гене *JAK1*, обладающую потенциальной терапевтической значимостью, однако в целом его результаты неутешительны: панельное секвенирование конкретных наборов генов при ГК позволяет выявить лишь малую долю генетических нарушений только в половине случаев, к тому же в ассоциированных с вирусной инфекцией.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что применение методов жидкостной биопсии для анализа опухоль-специфических нарушений генома имеет значительный клинический потенциал, однако нуждается в разработке новых подходов к персонализированному выбору генетических нарушений, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров для выявления в опухоль-специфической ц-ДНК. Таким образом, в настоящий момент выявление набора соматических мутаций в ц-ДНК, характерных для ГК, не является достаточно эффективным методом для использования в диагностике этого заболевания.

Выявление эпигенетических изменений циркулирующей ДНК

ДНК-метилирование – важный эпигенетический феномен, определяющий транскрипционную активность генома. Метилирование цитозина в положении 5' в составе CpG-динуклеотидов является одной из наиболее распространенных модификаций ДНК, около 70 % динуклеотидов в геноме человека метилированы. CpG-островки, GC-богатые последовательности ДНК длиной от 200 пар нуклеотидов, часто встречаются в областях с промоторов и первых экзонов генов. Принято считать, что гиперметилирование CpG-островков в составе промоторов генов связано с транскрипционной репрессией гена, а метилирование кодирующих участков гена повышает уровень транскрипции. Таким образом, метилирование отдельных участков генома может приводить как к супрессии, так и к активации генов в зависимости от локализации сайтов метилирования. Контроль экспрессии генов за счет эпигенетических модификаций различных последовательностей ДНК является фундаментальным процессом, который влияет на эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку, старение и другие ключевые биологические процессы. Изменение профиля метилирования ДНК играет существенную роль в возникновении и прогрессии опухолей. Геном опухолевых клеток имеет тенденцию к гипометилированию, наряду с гиперметилированием промоторов генов и специфических межгенных сайтов метилирования [10, 21].

Анализ метилирования ДНК проводят с помощью химической модификации цитозиновых оснований. На 1-м этапе в большинстве методов осуществляется бисульфитная конверсия денатурированной ДНК,

описанная М. Fromme и соавт. в 1992 г. [22]. Основой метода бисульфитной конверсии служит сульфонирование цитозина в 6-м положении и последующие дезаминирование цитозин-сульфоната и образование урацил-сульфоната, который при дальнейшей инкубации со щелочью превращается в урацил. Конверсии подвергается только неметилированный цитозин, 5-метилцитозин практически не взаимодействует с бисульфитом. На 2-м этапе в ходе ПЦР комплементарно урацилу включается тимин, а метилированному цитозину на комплементарной цепи соответствует гуанин [23]. Далее проводится анализ продукта амплификации и определяется соотношение цитозин/тимин для оценки числа 5-метилцитозина к общему числу цитозина. Для качественного анализа достаточно обнаружения ПЦР-продукта с помощью агарозного гель-электрофореза. В онкологии этот метод успешно применяют для изучения статуса метилирования отдельных генов, например генов *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*, *CDKN2B* и др. [24, 25]. Для количественной оценки метилирования может быть использована ПЦР в реальном времени [26].

Существует также методика, сочетающая бисульфитную конверсию и применение рестриктаз, специфичных к сайтам с неметилированным цитозином (Combined Bisulphite Restriction Analysis – комбинаторный бисульфитный рестрикционный анализ) [27].

В последние годы для крупномасштабного анализа метилирования ДНК чаще всего применяют различные методы секвенирования. После бисульфитной конверсии и амплификации интересующей области фрагменты ДНК могут быть секвенированы по Сэнгеру, подвергнуты пиросеквенированию или высокопроизводительному параллельному секвенированию. Каждая из этих технологий имеет свои преимущества и недостатки и может быть выбрана в зависимости от объекта и задач исследования [28].

В настоящее время на основании результатов изучения метиломов опухолевых и здоровых тканей пациентов сформированы базы данных (DiseaseMeth, Lnc2Meth), содержащие сведения о многочисленных сайтах, дифференциально метилированных в опухолях. Комбинации этих сайтов формируют профиль метилирования опухоли и могут отражать степень прогрессирования заболевания. Это открывает возможность для определения биомаркеров метилирования в крови пациентов за счет поиска сайтов, специфически метилированных в опухолях, и выявления аномально метилированных молекул в общем пуле ц-ДНК. Для введения в рутинную практику биомаркеров метилирования данные, полученные при изучении метиломов опухолевых тканей, должны пройти валидацию на большой выборке пациентов с использованием жидкостной биопсии.

Как подтверждают результаты многочисленных исследований, профили метилирования ц-ДНК в крови пациентов с ГК хорошо согласуются с данными по метилированию ДНК в образцах опухолевой ткани

[29]. В связи с этим поиск опухоль-специфических биомаркеров метилирования в циркулирующих опухолевых ДНК представляется перспективным направлением в диагностике и лечении ГК.

Ниже мы рассмотрим наиболее часто встречающиеся в литературе потенциально значимые для диагностики биомаркеры метилирования, выявляемые в ц-ДНК пациентов с ГК.

Нарушение метилирования генов-регуляторов каскада Wnt/ β -катенин

В 20–90 % клинических образцов ГК выявляется активация проопухолевого пути Wnt/ β -катенин [30]. Нарушение активности каскада происходит на ранних этапах гепатоканцерогенеза, способствует выживанию опухолевых клеток, стимулирует их пролиферацию, миграцию и инвазию и поддерживает рост опухоли за счет влияния на ее микроокружение [31].

В ГК часто наблюдается инактивация комплекса деградации β -катенина вследствие повреждающих мутаций его компонентов – белка аденоматозного полипозного колита (Adenomatous Polyposis Coli protein (APC)) и аксина 1 (AXIN1) [30]. Активация сигнального пути, вызванная накоплением β -катенина

в цитоплазме и его последующей транслокацией в ядро, может также обуславливаться метилированием промоторов генов, кодирующих отрицательные регуляторы каскада: APC, белки, секвестрирующие лиганды Wnt – Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) и Secreted FZD-related protein 1 (SFRP1), или E-кадгерин (CDH1), связывающий β -катенин в составе адгезионных комплексов [30, 31].

По данным обширного метаанализа 144 экспериментальных статей, посвященных сравнению профилей метилирования ДНК в нормальных и опухолевых тканях печени, для тканей ГК характерно гиперметилирование промоторов генов APC, WIF1, SFRP1 и CDH1. Кроме того, гиперметилирование генов WIF1 и CDH1 часто отмечается в ц-ДНК из сыворотки крови пациентов с ГК [29].

Промоторные последовательности генов APC, WIF1, SFRP1 и CDH1 вошли в состав панели из 7 биомаркеров, определение уровня метилирования которых предлагается использовать для оценки специфического показателя гиперметилирования генов в опухоли CIMP (CpG island methylator phenotype) (см. таблицу). Опухоли CIMP+, в которых отмечается гиперметилирование промоторов не менее 3 генов панели,

Потенциальные биомаркеры метилирования, исследуемые для диагностики и прогноза гепатоцеллюлярной карциномы в циркулирующей ДНК из крови

Potential methylation biomarkers of circulating DNA in blood studied for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma

Исследование Study	Число случаев ГК Number of HCC cases	Источник циркулирующих опухолевых ДНК Source of circulating tumor DNA	Число и тип контрольных образцов Number and type of control samples	Метод анализа уровня метилирования Method of methylation level analysis	Биомаркеры метилирования Methylation biomarkers	Показатели чувствительности/специфичности для диагностики ГК (%) или прогностическая значимость Sensitivity/specificity for HCC diagnosis (%) or prognostic value
[33]	220	Сыворотка Serum	202 ЗД 202 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов APC, RASSF1, BASP1, CCND2, CFTR, SPINT2, SRD5A2 Methylation sites in the APC, RASSF1, BASP1, CCND2, CFTR, SPINT2, SRD5A2 gene promoters	APC 17,6/78,6 RASSF1 83,3/58,9 BASP1 62,0/78,6 CCND2 64,8/42,9 CFTR 56,5/83,9 SPINT2 35,2/98,2 SRD5A2 8,3/92,9
[32]	108	Плазма Plasma	60 ЗД 60 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов APC, WIF1, RUNX3, DLC1, SFRP1, DKK, CDH1 Methylation sites in the APC, WIF1, RUNX3, DLC1, SFRP1, DKK, CDH1 gene promoters	Статус CIMP+ (гиперметилирование промоторов ≥ 3 генов панели) ассоциирован с более интенсивным прогрессированием заболевания CIMP+ status (hypermethylation of ≥ 3 panel gene promoters) is associated with more intensive disease progression
[56]	31	Плазма Plasma	10 ЗД 10 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов ELF, RASSF1A, CDKN2A, GSTP1 Methylation sites in the ELF, RASSF1A, CDKN2A, GSTP1 gene promoters	Чувствительность панели 93,6 Panel sensitivity 93.6

Продолжение таблицы
Continuation of table

Исследование Study	Число случаев ГК Number of HCC cases	Источник циркулирующих опухолевых ДНК Source of circulating tumor DNA	Число и тип контрольных образцов Number and type of control samples	Метод анализа уровня метилирования Method of methylation level analysis	Биомаркеры метилирования Methylation biomarkers	Показатели чувствительности/специфичности для диагностики ГК (%) или прогностическая значимость Sensitivity/specificity for HCC diagnosis (%) or prognostic value
[55]	50	Сыворотка Serum	50 ЗД 50 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>RASSF1</i> Methylation sites in the <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i> , <i>RASSF1</i> gene promoters	Для панели биомаркеров 84,0/94,0 For biomarker panel 84.0/94.0
[35]	183	Сыворотка Serum	50 ЗД 50 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов <i>CDH1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>ESR1</i> Methylation sites in the <i>CDH1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>ESR1</i> gene promoters	Для панели биомаркеров 84,5/66,3 For biomarker panel 84.5/66.3
[34]	98	Сыворотка Serum	80 ЗД 80 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайты метилирования в промоторах генов <i>RASSF1</i> , <i>APC</i> , <i>BVES</i> , <i>TIMP3</i> , <i>GSTP1</i> , <i>HOXA9</i> Methylation sites in the <i>RASSF1</i> , <i>APC</i> , <i>BVES</i> , <i>TIMP3</i> , <i>GSTP1</i> , <i>HOXA9</i> gene promoters	<i>RASSF1</i> 52,0/91,5 <i>APC</i> 36,7/96,4 <i>BVES</i> 29,6/97,6 <i>TIMP3</i> 11,2/98,8 <i>GSTP1</i> 17,4/98,7 <i>HOXA9</i> 20,4/95,8
[50]	8	Сыворотка Serum	10 ЗД 10 HD	МС-ПЦР MS-PCR	<i>RUNX3</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>RASSF1</i> , <i>CDH1</i>	—
[70]	1098	Плазма Plasma	835 ЗД 835 HD	Таргетное бисульфитное секвенирование ДНК Targeted bisulfate sequencing of DNA	Диагностическая панель (сайт метилирования, хромосомный локус): Diagnostic panel (methylation site, chromosome locus): cg10428836 (<i>BMPRIA</i>), cg26668608 (<i>PSD</i>), cg25754195 (<i>ARHGAP25</i>), cg05205842 (<i>KLF3</i>), cg11606215 (<i>PLAC8</i>), cg24067911 (<i>ATXN1</i>), cg18196829 (<i>Chr 6:170</i>), cg23211949 (<i>Chr 6:3</i>), cg17213048 (<i>ATAD2</i>), cg25459300 (<i>Chr 8:20</i>), cg10428836 (<i>BMPRIA</i>), Прогностическая панель (сайт метилирования, хромосомный локус): Prognostic panel (methylation site, chromosome locus): cg23461741 (<i>SH3PXD2A</i>), cg06482904 (<i>C11orf9</i>), cg25574765 (<i>PPF1A1</i>), cg07459019 (<i>Chr 17:78</i>), cg20490031 (<i>SERPINB5</i>), cg01643250 (<i>NOTCH3</i>), cg11397370 (<i>GRHL2</i>), cg11825899 (<i>TMEM8B</i>)	85,7–83,3/90,5–94,3
[46]	98	Плазма Plasma	191 ЗД 191 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>SEPT9</i> Methylation site in the <i>SEPT9</i> gene promoter	78,4–98,0/64,4–96,4

Окончание таблицы

End of table

Исследование Study	Число случаев ГК Number of HCC cases	Источник циркулирующих опухолевых ДНК Source of circulating tumor DNA	Число и тип контрольных образцов Number and type of control samples	Метод анализа уровня метилирования Method of methylation level analysis	Биомаркеры метилирования Methylation biomarkers	Показатели чувствительности/специфичности для диагностики ГК (%) или прогностическая значимость Sensitivity/specificity for HCC diagnosis (%) or prognostic value
[54]	22	Плазма, сыворотка Plasma, serum	10 ЗД 10 HD	МС-ПЦР MS-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>CDKN2A</i> Methylation site in the <i>CDKN2A</i> gene promoter	Чувствительность 73,0 Sensitivity 73.0
[57]	46	Сыворотка Serum	23 ЦП 23 CL	МС-ПЦР MS-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>CDKN2A</i> Methylation site in the <i>CDKN2A</i> gene promoter	47,8/82,6
[58]	66	Сыворотка Serum	43 ЦП + ХГ 43 CL + CH	МС-ПЦР, пиросеквенирование MS-PCR, pyrosequencing	Сайты метилирования в промоторе гена <i>CDKN2A</i> Methylation sites in the <i>CDKN2A</i> gene promoter	65,3/87,2
[64]	52	Сыворотка Serum	16 ЗД, 30 HCV+ 16 HD, 30 HCV+	ПЦР-РВ RT-PCR	Сайт метилирования в гене <i>GSTP1</i> Methylation site in the <i>GSTP1</i> gene promoter	69,2/93,3
[69]	40	Плазма Plasma	20 ЗД 20 HD	Метил-специфическая рестрикция с ПЦР-РВ Methyl-specific restriction with RT-PCR	Сайт метилирования в промоторе гена <i>RASSF1</i> Methylation site in the <i>RASSF1</i> gene promoter	75,0/80,0

Примечание. В качестве контроля в исследованиях использовали циркулирующие опухолевые ДНК из плазмы или сыворотки крови здоровых доноров (ЗД), пациентов с циррозом печени (ЦП) или хроническим гепатитом (ХГ). ГК – гепатоцеллюлярная карцинома; МС-ПЦР – метил-специфическая полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени; HCV+ – пациенты, инфицированные вирусом гепатита С человека.

Note. In the studies, circulating tumor DNA from plasma or serum of healthy donors (HD), patients with cirrhosis of the liver (CL) or chronic hepatitis (CH) was used as control. HCC – hepatocellular carcinoma; MS-PCR – methyl-specific polymerase chain reaction; RT-PCR – real-time polymerase chain reaction; HCV+ – patients infected by human hepatitis C virus.

характеризуются более интенсивным прогрессированием заболевания по сравнению с SIMP-вариантами [32]. Гиперметилирование промотора гена *APC*, включенного в тестируемые в настоящее время панели биомаркеров для диагностики ГК, характеризуется специфичностью, сопоставимой с АФП, но более низкой чувствительностью по сравнению с мультигенными панелями биомаркеров метилирования [33, 34]. С.У. Dou и соавт. предлагают использовать гиперметилирование промоторов генов *CDH1*, ДНК-метилтрансферазы β *DNMT3B* и эстрогенового рецептора α *ESR1*, выявляемое в ц-ДНК из сыворотки крови, в качестве биомаркера для ранней диагностики ГК, ассоциированных с инфекцией HBV [35].

Гиперметилирование промоторов генов *APC*, *WIFI*, *SFRP1* и *CDH1* в ц-ДНК из сыворотки или плазмы крови рассматривается также в качестве потенциального биомаркера для диагностики КРР [36–38]. Кроме того, CpG-богатый участок промотора гена *SFRP1* входит в состав панели биомаркеров метилирования, которую предлагается использовать для диагностики аденокарциномы поджелудочной железы I и II стадий [39].

SEPT9. Септин 9, кодируемый геном *SEPT9*, является ГТФ-связывающим скаффолд-белком, образующим филаменты, участвующие в организации внутриклеточного пространства, поддержании структуры мембран и цитокинезе [40]. Разнородные данные о нарушении экспрессии гена *SEPT9* в разных типах злокачественных

новообразований и его возможной роли в канцерогенезе обусловлены существованием нескольких альтернативных транскриптов *SEPT9*, тканеспецифически экспрессирующихся в опухолях в зависимости от статуса метилирования промотора гена [41].

Гиперметилирование промотора гена *SEPT9* – достоверно эффективный биомаркер для малоинвазивной диагностики КРП методом жидкостной биопсии. Разработанный компанией Epigenomics (США) тест Epi *proColon*, который основан на ПЦР-опосредованном количественном определении уровня метилирования сайта CpG3 в промоторной области V2 гена *SEPT9* в ц-ДНК из плазмы крови [42], является единственным анализом крови, который был успешно апробирован и одобрен для скрининга КРП Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США [43]. По данным метаанализа, по сравнению с другими разработанными лабораторными тестами для скрининга КРП (тесты на скрытую кровь и ДНК в кале), тест Epi *proColon* характеризуется высокими показателями чувствительности и специфичности – 71,1–95,6 и 81,5–99,1 % соответственно [44].

Гиперметилирование промотора гена *SEPT9* также характерно для ГК. По данным масштабного исследования по профилированию метилома в 221 образце ГК методом гибридизации ДНК со специфичными к участкам метилирования пробами на микрочипе Illumina Human Methylation 450, гиперметилирование промотора гена *SEPT9* выявляется в 61 % исследованных опухолей и рассматривается как возможный эпигенетический драйвер при гепатоканцерогенезе [45]. Определение уровня метилирования сайта CpG3 в промоторной области V2 гена *SEPT9* в ц-ДНК из плазмы крови пациентов с ГК с использованием теста компании Epigenomics показало большую диагностическую точность по сравнению с АФП и в дальнейшем может найти применение в клинической практике [46].

Гиперметилирование сайтов в гене *RUNX3*. *RUNX3* относится к семейству транскрипционных факторов, содержащих домен Runt (Runt-related transcription factors) и являющихся одними из ключевых регуляторов экспрессии генов в процессах гематопоэза, остеогенеза и нейрогенеза. Предполагается, что в некоторых типах тканей *RUNX3* выполняет функцию опухолевого супрессора, и его инактивация может способствовать возникновению опухолей желудочно-кишечного тракта, рака молочной железы, легкого и кожи [47].

RUNX3 – негативный регулятор транскрипции генов, кодирующих участников процессов пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и эпителиально-мезенхимального перехода при гепатоканцерогенезе. Снижение экспрессии гена *RUNX3* описано в 50–92 % случаев ГК [48]. Гиперметилирование сайтов в гене *RUNX3* или его промоторе – частое событие при ГК, детектируемое как в опухолевой ткани, так и в ц-ДНК из крови пациентов [29, 49].

В комбинации с другими биомаркерами определение статуса метилирования сайтов в промоторе гена *RUNX3* в ц-ДНК из сыворотки или плазмы крови использовали для оценки диагностического потенциала мультигенной панели [50] и для прогнозирования течения заболевания в зависимости от уровня метилирования генов в опухоли [32].

По данным метаанализа J. Wen и соавт., гиперметилирование промотора гена *RUNX3* является одним из перспективных биомаркеров для диагностики рака желудка на основе жидкостной биопсии ввиду высоких показателей чувствительности и специфичности [51].

Нарушение метилирования генов *CDKN2A* и *CDKN2B*. Белки p16/INK4a и p14/ARF, кодируемые геном *CDKN2A*, и p15/INK4b, продукт гена *CDKN2B*, являются регуляторами клеточного цикла. p16/INK4a и p15/INK4b ингибируют циклинзависимые киназы 4/6 (CDK4/6); p14/ARF обеспечивает стабилизацию p53, связываясь и секвестрируя его E3-убиквитин лигазу MDM2 [52]. Инактивация этих опухолевых супрессоров, вызванная мутациями в локусе генов *CDKN2A/CDKN2B* или гиперметилированием их промоторов, характерна для многих типов рака, включая ГК, и связана с поддержанием неконтролируемого деления опухолевых клеток [49, 52].

По данным метаанализа С. Zhang и соавт., гиперметилирование сайтов в промоторах генов *CDKN2A* и *CDKN2B* является одним из наиболее распространенных нарушений метилирования при ГК [29]. Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *CDKN2A*, приводящее к снижению уровня экспрессии p16, отмечается в 60–80 % образцов ГК [49]. Согласно метаанализу W.H. Ren и соавт. гиперметилирование сайтов в гене *CDKN2B* и его промоторе выявляется в 37,5 % образцов ГК [53].

Корреляция уровней метилирования сайта в промоторе гена *CDKN2A*, выявляемых в образцах тканей ГК и в ц-ДНК из плазмы или сыворотки крови, указывает на перспективность использования этого биомаркера для малоинвазивной диагностики ГК [29, 54].

Анализ уровня метилирования сайтов в промоторах генов *CDKN2A* и *CDKN2B* в комбинации с другими биомаркерами метилирования в ц-ДНК из плазмы или сыворотки крови пациентов с ГК характеризуется высокими (84,0–93,6 %) показателями чувствительности для диагностики ГК [55, 56]. Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *CDKN2A* в ц-ДНК также рассматривается в качестве потенциального диагностического биомаркера, показатели чувствительности и специфичности которого составляют 47,8–73,0 и 82,6–87,2 % соответственно [54, 57, 58].

Гиперметилирование промотора гена *CDKN2A* во внеклеточной ДНК применяется в качестве потенциального биомаркера при анализах мокроты для диагностики рака легкого [59].

Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1*. Глутатион-S-трансфераза P1 (*GSTP1*) относится

к ферментам II фазы нейтрализации токсических веществ, лекарств и эндогенных метаболитов и катализирует их конъюгацию с глутатионом. Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1*, приводящее к инактивации его транскрипции, выявляется при лимфопролиферативных заболеваниях и в солидных опухолях — раке предстательной железы, молочной железы и печени [60, 61]. Подавление экспрессии *GSTP1* и снижение уровня синтеза белка в ГК коррелирует с низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости пациентов. Гиперэкспрессия *GSTP1* в клетках ГК приводит к снижению их пролиферативного потенциала и клоногенности *in vitro* и замедлению скорости роста опухолей *in vivo* [62].

Метилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1* часто детектируется в опухолевой ткани и ц-ДНК из сыворотки крови пациентов с ГК [29], однако уровень метилирования может существенно варьировать в зависимости от исследуемого сайта в опухолях различной этиологии [63]. Так, определение уровня метилирования сайта в гене *GSTP1* в ц-ДНК из сыворотки крови при инфекции HCV показало большую специфичность (93,3 %) по сравнению с определением сывороточного АФП (72,7 %) для диагностики ГК [64]. В то же время для пациентов с HBV-ассоциированными ГК индивидуальная диагностическая значимость метилирования сайта в промоторе *GSTP1* невысока [34]. Этот биомаркер может быть использован для диагностики ГК в составе мультигенных панелей: по данным W. Huang и соавт., такая мультигенная панель отличается более высоким показателем чувствительности (93,6 %) по сравнению с АФП (48,4 %) [56].

Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *GSTP1* в ц-ДНК из сыворотки/плазмы крови или мочи рассматривается в качестве возможного биомаркера для диагностики и прогноза рака предстательной железы [65].

RASSF1. RASSF1, белок-ингибитор протоонкогенов семейства Ras (Ras association domain-containing protein 1), является регулятором клеточного цикла и рецепторзависимого пути индукции апоптоза. Дефицит RASSF1, вызванный потерей гетерозиготности по локусу гена, гиперметилированием его промотора, микроРНК-опосредованной РНК-интерференцией (например, за счет репрессорного действия микроРНК-602) или индуцированной SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) убиквитинзависимой деградацией белка при переходе в S-фазу клеточного цикла наблюдается в 48–100 % случаев ГК [66, 67].

Гиперметилирование промотора гена *RASSF1* часто детектируется в образцах ГК и ц-ДНК из плазмы/сыворотки крови и мочи пациентов с ГК [29, 49]. Гиперметилирование промотора гена *RASSF1* в опухолевой ткани и ц-ДНК из сыворотки крови пациентов с ГК коррелирует с низким уровнем синтеза белка в ткани ГК и неблагоприятным прогнозом течения

заболевания, связанным с метастазированием опухоли и ее инвазией в воротную вену печени [68].

Гиперметилирование сайтов в промоторе гена *RASSF1* в ц-ДНК из крови обладает высокой диагностической значимостью: показатели чувствительности и специфичности составляют 52–75 и 58,9–91,5 % соответственно [33, 34, 69]. В то же время диагностическая точность панелей биомаркеров метилирования, в состав которых входят сайты в промоторе гена *RASSF1* (см. таблицу), превышает индивидуальные показатели этого биомаркера и характеризуется чувствительностью в диапазоне 73,5–84,0 % и специфичностью 91,1–94,0 % [34, 55].

Оценку уровня метилирования промотора гена *RASSF1* в ц-ДНК в комбинации с другими биомаркерами метилирования предлагается также использовать для диагностики и прогноза течения рака молочной железы [65].

Панели биомаркеров метилирования. В представленных исследованиях большинство биомаркеров метилирования, детектируемых в ц-ДНК крови, объединены в диагностические панели, насчитывающие от 3 до 10 сайтов метилирования в различных локусах (см. таблицу). Это отражает тенденцию к объединению биомаркеров в группы для повышения диагностической мощности анализа: чувствительность диагностики ГК с использованием панелей биомаркеров колеблется в пределах 84,0–93,6 %, специфичность составляет 66,3–94,3 %, что в целом превышает данные показатели для индивидуальных биомаркеров. По приведенным сведениям, наиболее часто в диагностические панели входят гены *APC*, *CDH1*, *CDKN2A* и *RASSF1*. Остальные гены, для которых описаны диагностические биомаркеры метилирования ГК, описаны не более чем в 2 исследованиях, что указывает на то, что профиль метилирования генов, которые могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров для жидкостной биопсии ГК, пока охарактеризован недостаточно.

Заключение

Высокая гетерогенность и низкая частота встречаемости конкретных соматических мутаций в ГК по сравнению с другими типами рака являются существенным препятствием для их использования в качестве биомаркеров для диагностики или прогнозирования течения заболевания. Изменение тканеспецифических паттернов метилирования генов при канцерогенезе и существование нарушений, специфических для ГК, открывают возможность для использования изменений метилирования конкретных сайтов или участков генов как биомаркеров ГК. Поскольку профили метилирования генов в опухолевой ткани коррелируют с нарушениями, обнаруживаемыми в ц-ДНК из крови пациентов с ГК, детекция эпигенетических нарушений с помощью жидкостной биопсии имеет несомненный потенциал для использования в клинической практике. К настоящему

времени ни для одного из индивидуальных маркеров не описано чувствительности и специфичности, достаточных для надежной диагностики ГК, в то время как использование панелей из нескольких маркеров позволяет достичь существенного повышения точности анализа. Дальнейшее изучение биомаркеров метилирования и их экспериментальная валидация на больших выборках

образцов позволят выявить наиболее перспективные биомаркеры и их сочетания для диагностики и прогноза ГК. Огромное значение для внедрения таких биомаркеров в клиническую практику имеет разработка чувствительных методов количественной оценки доли опухолевых специфических нарушений в общем пуле свободно циркулирующих нуклеиновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018. DOI: 10.3322/caac.21492. PMID: 30207593.
- Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2018. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2018. 250 p. (In Russ.)].
- Marquard J.U., Galle P.R., Teufel A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): An emerging field for advanced technologies. *J Hepatol* 2012;56(1):267–75. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.07.007. PMID: 21782758.
- Llovet J.M., Zucman-Rossi J., Pikarsky E. et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16018. DOI: 10.1038/nrdp.2016.18. PMID: 27158749.
- Abelev G.I., Eraiser T.L. Cellular aspects of alpha-fetoprotein reexpression in tumors. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):95–107. PMID: 10202131.
- Rich N., Singal A.G. Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014;28(5):843–53. DOI: 10.1016/j.bpg.2014.07.018. PMID: 25260312.
- Siravegna G., Marsoni S., Siena S., Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.14. PMID: 28252003.
- Wan J.M., Massie C., Garcia-Corbacho J. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17(4):223–38. DOI: 10.1038/nrc.2017.7. PMID: 28233803.
- Ботезату И.В., Панчук И.О., Коломейцева А.А. и др. Таргетная жидкостная биопсия посредством «обогащенной» полимеразной цепной реакции и анализа плавления ДНК. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(1):35–42. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-1-35-42. [Botezatu I.V., Panchuk I.O., Kolomeytseva A.A. et al. Target liquid biopsy using “enriched” polymerase chain reaction and DNA melting analysis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):35–42. (In Russ.)].
- Yin C.Q., Yuan C.H., Qu Z. et al. Liquid biopsy of hepatocellular carcinoma: circulating tumor-derived biomarkers. *Dis Markers* 2016;1427849. DOI: 10.1155/2016/1427849. PMID: 27403030.
- Okajima W., Komatsu S., Ichikawa D. et al. Liquid biopsy in patients with hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J Gastroenterol* 2017;23(31):5650–68. DOI: 10.3748/wjg.v23.i31.5650. PMID: 28883691.
- Fan J.L., Yang Y.F., Yuan C.H. et al. Circulating tumor cells for predicting the prognostic of patients with hepatocellular carcinoma: a metaanalysis. *Cell Physiol Biochem* 2015;37(2):629–40. DOI: 10.1159/000430382. PMID: 26344495.
- Mandel P., Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *Comptes Rendus de l’Academie des Sciences de Paris* 1948;142:241–3. PMID: 18875018.
- Vasioukhin V., Anker P., Maurice P. et al. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994;86:774–9. PMID: 7918071.
- Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H. et al. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:67–71. PMID: 8118388.
- Zhou J., Yu L., Gao X. et al. Plasma microRNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29(36):4781–8. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.2697. PMID: 22105822.
- Diaz L.A., Williams R., Wu J. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486(7404):537–40. DOI: 10.1038/nature11219. PMID: 22722843.
- Han Z.G. Functional genomic studies: insights into the pathogenesis of liver cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012;13(1):171–205. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163752. PMID:22703171.
- Ng C.K.Y., Di Costanzo G.G., Terracciano L.M., Piscuoglio S. Circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma: current insights and outlook. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:78. DOI: 10.3389/fmed.2018.00078. PMID: 29632864.
- Labgaa I., Villacorta-Martin C., D’Avola D. et al. A pilot study of ultra-deep targeted sequencing of plasma DNA identifies driver mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2018;37(27):3740–52. DOI: 10.1038/s41388-018-0206-3. PMID: 29628508.
- Винокурова С.В. Генетические и эпигенетические механизмы регуляции вируса папиллом человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(2):18–25. DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.2.18-25. [Vinukurova S.V. Genetic and epigenetic mechanisms of regulation of human papillomavirus. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(2):18–25. (In Russ.)].
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(5):1827–31. PMID: 1542678.
- Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(18):9821–6. PMID: 8790415.
- Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В. и др. Сравнительный анализ эпигенетических и белковых маркеров в крови больных немелкоклеточным раком легких. *Сибирский онкологический журнал* 2011;5(47):40–5. [Ponomareva A.A., Rykova E.Yu., Cherdyntseva N.V. et al. Comparative analysis of epigenetic and protein markers in the blood of patients with non-small cell lung

- cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2011;5(47):40–5. (In Russ.)].
25. Denisov E.V., Sukhanovskaya T.V., Dultseva T.S. et al. Coordination of TP53 abnormalities in breast cancer: data from analysis of TP53 polymorphisms, loss of heterozygosity, methylation, and mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15(12):901–7. DOI: 10.1089/gtmb.2011.0038. PMID: 21810023.
 26. Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K. et al. MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28(8):e32. PMID: 10734209.
 27. Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25(12):2532–4. PMID: 9171110.
 28. Heyn H., Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012;13(10):679–92. DOI: 10.1038/nrg3270. PMID: 22945394.
 29. Zhang C., Li J., Huang T. et al. Meta-analysis of DNA methylation biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2016;7(49):81255–67. DOI: 10.18632/oncotarget.13221. PMID: 27835605.
 30. Liu L.J., Xie S.X., Chen Y.T. et al. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016;22(33):7486–99. DOI: 10.3748/wjg.v22.i33.7486. PMID: 27672271.
 31. Pez F., Lopez A., Kim M. et al. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *J Hepatol* 2013;59(5):1107–17. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.07.001. PMID: 23835194.
 32. Liu J.B., Zhang Y.X., Zhou S.H. et al. CpG island methylator phenotype in plasma is associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *World J Gastroenterol* 2011;17(42):4718–24. DOI: 10.3748/wjg.v17.i42.4718. PMID: 22180715.
 33. Iizuka N., Oka M., Sakaida I. et al. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. *Clin Chim Acta* 2011;412(1–2):152–8. DOI: 10.1016/j.cca.2010.09.028. PMID: 20883676.
 34. Dong X., Hou Q., Chen Y., Wang X. Diagnostic value of the methylation of multiple gene promoters in serum in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dis Markers* 2017;2017:2929381. DOI: 10.1155/2017/2929381. PMID: 28951629.
 35. Dou C.Y., Fan Y.C., Cao C.J. et al. Sera DNA methylation of CDH1, DNMT3b and ESR1 promoters as biomarker for the early diagnosis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2016;61(4):1130–8. DOI: 10.1007/s10620-015-3975-3. PMID: 26660680.
 36. Pack S.C., Kim H.R., Lim S.W. et al. Usefulness of plasma epigenetic changes of five major genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2013;28(1):139–47. DOI: 10.1007/s00384-012-1566-8. PMID: 22990173.
 37. Roperch J.P., Incitti R., Forbin S. et al. Aberrant methylation of NPY, PENK, and WIF1 as a promising marker for blood-based diagnosis of colorectal cancer. *BMC Cancer* 2013;13:566. DOI: 10.1186/1471-2407-13-566. PMID: 24289328.
 38. Bedin C., Enzo M.V., Del Bianco P. et al. Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2017;140(8):1888–98. DOI: 10.1002/ijc.30565. PMID: 27943272.
 39. Henriksen S.D., Madsen P.H., Larsen A.C. et al. Cell-free DNA promoter hypermethylation in plasma as a diagnostic marker for pancreatic adenocarcinoma. *Clin Epigenetics* 2016;8:117. DOI: 10.1186/s13148-016-0286-2. PMID: 27891190.
 40. Estey M.P., Kim M.S., Trimble W.S. Septins. *Curr Biol* 2011;21(10):R384–7. DOI: 10.1016/j.cub.2011.03.067. PMID: 21601794.
 41. Wasserkort R., Kalmar A., Valcz G. et al. Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer* 2013;13:398. DOI: 10.1186/1471-2407-13-398. PMID: 23988185.
 42. <http://www.epiprocolon.com/wp-content/uploads/sites/3/2018/04/EU-EpiMKT-0062Rev3-8.3x11.7-Singles.pdf>
 43. Song L., Yu H., Jia J., Li Y. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and prognosis. *Cancer Biomark* 2017;18(4):425–32. DOI: 10.3233/CBM-160321. PMID: 28128742.
 44. Song L., Jia J., Peng X. et al. The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: a meta-analysis. *Sci Rep* 2017;7(1):3032. DOI: 10.1038/s41598-017-03321-8. PMID: 28596563.
 45. Villanueva A., Portela A., Sayols S. DNA methylation-based prognosis and epidriviers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015;61(6):1945–56. DOI: 10.1002/hep.27732. PMID: 25645722.
 46. Oussalah A., Rischer S., Bensenane M. et al. Plasma mSEPT9: a novel circulating cell-free DNA-based epigenetic biomarker to diagnose hepatocellular carcinoma. *EBioMedicine*. 2018;30:138–47. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.029. PMID: 29627389.
 47. Lotem J., Levanon D., Negreanu V. et al. Runx3 at the interface of immunity, inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015;1855(2):131–43. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.01.004. PMID: 25641675.
 48. Shiraha H., Nishina S., Yamamoto K. Loss of runt-related transcription factor 3 causes development and progression of hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* 2011;112(3):745–9. DOI: 10.1002/jcb.22973. PMID: 21328447.
 49. Khan F.S., Ali I., Afridi U.K. et al. Epigenetic mechanisms regulating the development of hepatocellular carcinoma and their promise for therapeutics. *Hepatology* 2017;11(1):45–53. DOI: 10.1007/s12072-016-9743-4. PMID: 27271356.
 50. Tan S.H., Ida H., Lau Q.C. et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3. *Oncol Rep* 2007;18(5):1225–30. PMID: 17914577.
 51. Wen J., Zheng T. Hu K. et al. Promoter methylation of tumor-related genes as a potential biomarker using blood samples for gastric cancer detection. *Oncotarget* 2017;8(44):77783–93. DOI: 10.18632/oncotarget.20782. PMID: 29100425.
 52. Gil J., Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(9):667–77. DOI: 10.1038/nrm1987. PMID: 16921403.
 53. Ren W.H., Li Y.W., Li R. et al. P15 gene methylation in hepatocellular carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):4762–8. PMID: 26131050.
 54. Wong I.H., Lo Y.M., Zhang J. et al. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999;59(1):71–3. PMID: 9892188.
 55. Zhang Y.J., Wu H.C., Shen J. et al. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 2007;13(8):2378–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1900. PMID: 17438096.
 56. Huang W., Li T., Yang W. Analysis of DNA methylation in plasma for monitoring hepatocarcinogenesis. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015;19(6):295–302. DOI: 10.1089/gtmb.2014.0292. PMID: 25923138.
 57. Chu H.J., Heo J., Seo S.B. et al. Detection of aberrant p16INK4A methylation in sera of patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2004;19(1):83–6. DOI: 10.3346/jkms.2004.19.1.83. PMID: 14966347.
 58. Huang G., Krocker J.D., Kirk J.L. et al. Evaluation of INK4A promoter methylation using pyrosequencing and circulating cell-free DNA from patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2014;52(6):899–909. DOI: 10.1515/cclm-2013-0885. PMID: 24406287.
 59. Liu D., Peng H., Sun Q. et al. The indirect efficacy comparison of DNA methylation in sputum for early screening and auxiliary

- detection of lung cancer: a meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14(7). pii:E679. DOI: 10.3390/ijerph14070679. PMID: 28644424.
60. Schnekenburger M., Karius T., Diederich M. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: from detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Front Pharmacol* 2014;5:170. DOI: 10.3389/fphar.2014.00170. PMID: 25076909.
61. Li Y., Cai Y., Chen H., Mao L. Clinical significance and association of GSTP1 hypermethylation with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2018;14(Suppl):S486–9. DOI: 10.4103/0973-1482.181179. PMID: 29970711.
62. Liu X., Tan N., Liao H. et al. High GSTP1 inhibits cell proliferation by reducing Akt phosphorylation and is associated with a better prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017;9(10):8957–71. DOI: 10.18632/oncotarget.23420. PMID: 29507666.
63. Jain S., Chen S., Chang K.C. et al. Impact of the location of CpG methylation within the GSTP1 gene on its specificity as a DNA marker for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012;7(4):e35789. DOI: 10.1371/journal.pone.0035789. PMID: 22536438.
64. Iizuka N., Sakaida I., Moribe T. et al. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2006;26(6C):4713–9. PMID: 17214331.
65. Leygo C., Williams M., Jin H.C. et al. DNA methylation as a noninvasive epigenetic biomarker for the detection of cancer. *Dis Markers* 2017;2017:3726595. DOI: 10.1155/2017/3726595. PMID: 29038612.
66. Delire B., Stärkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest* 2015;45(6):609–23. DOI: 10.1111/eci.12441. PMID: 25832714.
67. Calvisi D.F., Evert M., Dombrowski F. Pathogenetic and prognostic significance of inactivation of RASSF proteins in human hepatocellular carcinoma. *Mol Biol Int* 2012;2012:849874. DOI: 10.1155/2012/849874. PMID: 22548173.
68. Hu L., Chen G., Yu H., Qiu X. Clinicopathological significance of RASSF1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2010;4(1):423–32. DOI: 10.1007/s12072-010-9164-8. PMID: 20305761.
69. Mohamed N.A., Swify E.M., Amin N.F. et al. Is serum level of methylated RASSF1A valuable in diagnosing hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral hepatitis C? *Arab J Gastroenterol* 2012;13(3):111–5. DOI: 10.1016/j.ajg.2012.06.009. PMID: 23122451.
70. Xu R.H., Wei W., Krawczyk M. et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nat Mater* 2017;16(11):1155–61. DOI: 10.1038/nmat4997. PMID: 29035356.

Вклад авторов

И.Ф. Кустова, А.С. Макарова: написание текста;
Н.Л. Лазаревич: концепция и редактирование.

Authors' contributions

I. F. Kustova, A. S. Makarova: article writing;
N. L. Lazarevich: concept and editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

И.Ф. Кустова/I. F. Kustova: <https://orcid.org/0000-0001-6480-0793>
А.С. Макарова/A. S. Makarova: <https://orcid.org/0000-0002-9711-9256>
Н.Л. Лазаревич/N. L. Lazarevich <https://orcid.org/0000-0001-9560-1383>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполняется в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Минздрава России.

Financing. The study is conducted as part of an experimental national task by the Ministry of Health of Russia under the coordination of the Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 01.10.2018. Принята к публикации: 31.10.2018.

Article received: 01.10.2018. Accepted for publication: 31.10.2018.