

*На правах рукописи*

Пономарева Анастасия Алексеевна

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС ГЕНОВ ОПУХОЛЕВОЙ СУПРЕССИИ  
И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ  
ДНК В КРОВИ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО**

03.02.07 – генетика  
14.01.12 – онкология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Томск – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательском институте онкологии» Сибирского отделения РАН, г. Томск и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор  
**Чердынцева Надежда Викторовна**

доктор биологических наук  
**Рыкова Елена Юрьевна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
**Лебедев Игорь Николаевич**

доктор медицинских наук  
**Юнусова Наталья Валерьевна**

Ведущая организация: Федеральное государственное  
бюджетное учреждение  
«Медико-генетический научный центр»  
РАМН, г. Москва

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 года в \_\_ час. \_\_ мин. на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «НИИ медицинской генетики» СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «НИИ медицинской генетики» СО РАМН

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук, профессор

Кучер А.Н.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы:** Рак легкого (РЛ) – наиболее распространенная форма злокачественных новообразований (12,8 % в структуре онкологической заболеваемости населения мира), занимающая первое место по общей летальности от онкологических заболеваний у мужчин (1,2 млн. в год) (Мерабишвили, 2006; Чиссов, 2007). Известно, что злокачественная трансформация клеток и опухолевая прогрессия характеризуются приобретением и накоплением в клетке множества генетических и эпигенетических изменений. Основой эпигенетической модификации ДНК является присоединение метильной группы к цитозину в последовательностях цитозин-гуанин (СрG). Метилирование СрG в промоторных областях генов опухолевой супрессии при канцерогенезе связано с потерей генной экспрессии и прекращением образования белкового продукта, что приводит к утрате контроля дифференцировки и деления трансформированных клеток (Залетаев, 2008; Esteller, 2008; Duffy et al., 2009; Пузырев, 2011). При исследовании ДНК опухоли на различных стадиях развития патологического процесса было показано увеличение частоты выявления метилированных форм нескольких генов (*CDKN2A*, *TIMP3*, *DAPK*, *MGMT*, *RARB2*, *RASSF1A*, *hTERT* и др.) в ряду от атипичной аденоматозной гиперплазии до аденокарциномы легких (Licchesi et al., 2008).

Рак легкого, как и большинство злокачественных новообразований, развивается на фоне предопухолевых изменений эпителия. У больных с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и диспластическими изменениями эпителия существенно повышается риск развития рака легкого (Mannino, 2003). Недавно появились данные о том, что эпигенетические факторы играют важную роль в регуляции экспрессии ряда генов опухолевой супрессии при ХОБЛ (Yang, Schwartz, 2011). Дальнейшие исследования молекулярно-генетических закономерностей прогрессии предопухолевых изменений будут способствовать выявлению механизмов их малигнизации и потенциальных мишеней для воздействия на ранних стадиях процесса с целью его реверсии или предотвращения.

Чрезвычайно актуальным представляется выявление маркеров прогноза развития предопухолевых изменений, ранней диагностики и прогнозирования клинического течения рака легкого, которые можно было бы детектировать в биологических жидкостях организма, для создания методов малоинвазивной диагностики. В связи с этим большое внимание уделяется изучению ДНК, циркулирующих в плазме или сыворотке крови (цирДНК), концентрация и состав которых существенно изменяются при развитии злокачественных новообразований (Laktionov et al., 2004; Tamkovich et al., 2005; Van der Drift et al., 2010; Vlassov et al., 2010). Формирование пула цирДНК определяется сложными взаимодействиями в процессе их образования, циркуляции, элиминации. Ряд исследований целевых генов-кандидатов и работы по полногеномному анализу циркулирующих ДНК показали, что даже в крови здоровых людей относительная представленность разных последовательностей цирДНК отличается от таковой в ДНК генома родительских клеток (Anker et al.,

2001; Korshunova et al., 2008; Beck et al, 2009, 2010).

Показано, что эпигенетические изменения могут быть выявлены в крови пациентов с высокой частотой и отвечают требованиям, предъявляемым к диагностическим маркерам (Fleischaker, Schmidt, 2007). Однако результаты исследований говорят о большей сложности эпигенетических характеристик цирДНК крови, чем предполагалось ранее. Сравнительное исследование метилирования отдельных CpG-сайтов цирДНК плазмы крови у больных раком молочной железы и здоровых доноров с помощью метода массового параллельного пиросеквенирования показало, что в составе таких ДНК можно обнаружить любой из возможных профилей метилирования исследуемой области гена (Korshunova et al., 2008). Эпигенетический статус фрагментов цирДНК может влиять на их взаимодействие с клетками крови, эндотелия сосудов, определять их способность к депонированию в тканях, рециркуляции в крови и выведению из организма (Брызгунова и др., 2010). В связи с этим информативным представляется исследование цирДНК, связанных с клеточной поверхностью (скп-цирДНК).

Проведение сравнительного анализа эпигенетического статуса и количественного состава цирДНК в крови больных с предопухолевыми процессами и злокачественными новообразованиями актуально для получения новых знаний о механизмах генерации циркулирующих нуклеиновых кислот в норме и при развитии онкологических заболеваний. Выявление изменений цирДНК крови имеет также очевидное практическое значение, поскольку может привести к разработке надежных диагностических и прогностических маркеров рака.

Одним из признаков злокачественной трансформации является изменение уровня и профиля белковой экспрессии в клетках опухоли, которое сопровождается повышением уровня определенных белков в крови пациентов. Белковые онкомаркеры, применяемые в клинической практике у больных раком легких (РЭА, CYFRA 21-1 и др.), имеют высокую специфичность (до 97%), однако не обладают достаточной чувствительностью (не более 60%) (Holdenrieder et al., 2008). Анализ белковых онкомаркеров в сопоставлении с эпигенетическими изменениями генов опухолевой супрессии представляется актуальным для выявления ассоциации процессов их появления в крови в ходе развития опухоли. Применение независимых белковых и эпигенетических маркеров в комбинации может быть эффективным подходом для разработки специфичных и чувствительных методов диагностики РЛ на ранних и предклинических стадиях, а также послеоперационного мониторинга и прогноза клинического течения заболевания.

**Цель работы:** Изучить особенности концентрации и эпигенетического статуса циркулирующих ДНК крови при злокачественных новообразованиях и хронической обструктивной болезни легких.

**Задачи исследования:**

1. Провести количественный анализ фрагментов однокопийного гена *ACTB* и повторяющихся элементов *LINE-1* циркулирующих ДНК плазмы и фракции, связанной с поверхностью клеток крови, у больных хронической

- обструктивной болезнью, раком легких и здоровых лиц.
2. Определить уровень метилирования гена опухолевой супрессии *RARB2* в циркулирующих ДНК крови у больных хронической обструктивной болезнью, раком легких и здоровых лиц.
  3. Оценить индекс метилирования, отражающий соотношение метилированных и неметилированных аллелей генов опухолевой супрессии *RARB2* и *RASSF1A*, в циркулирующих ДНК крови у больных хронической обструктивной болезнью, раком легких и здоровых лиц.
  4. Провести анализ ассоциации концентрации фрагментов ДНК, уровня и индекса метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* в циркулирующих ДНК крови с патогенетически значимыми признаками и исходом заболевания при раке легкого.
  5. Изучить характер изменений индекса метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* в циркулирующих ДНК у больных раком легкого после комбинированного лечения и на этапах мониторинга в сопоставлении с данными клинико-инструментального обследования.
  6. Провести анализ ассоциации повышенного уровня метилированных аллелей генов *RARB2* и *RASSF1A* и белковых онкомаркеров (РЭА и CYFRA 21-1) в крови больных раком легкого.

**Научная новизна:** Впервые проведен анализ эпигенетического статуса генов опухолевой супрессии *RARB2*, *RASSF1A*, концентрации и характера распределения фрагментов однокопийного гена *ACTB*, *LINE-1* повторов, в циркулирующих ДНК крови у больных хронической обструктивной болезнью, раком легких и здоровых лиц. Показано статистически значимое снижение концентрации фрагментов гена *ACTB* и *LINE-1* элементов в циркулирующих ДНК плазмы и в циркулирующих ДНК, связанных с поверхностью клеток крови, у больных с патологиями легкого по сравнению со здоровыми донорами. Получены новые данные об увеличении уровня метилирования гена *RARB2* во фракциях циркулирующих ДНК у больных хронической обструктивной болезнью и раком легких по сравнению со здоровыми донорами. Выявлена ассоциация повышенного уровня метилирования гена *RARB2* в циркулирующих ДНК плазмы крови с неблагоприятным исходом у больных раком легкого на основе анализа показателей общей выживаемости. Показано, что одновременная оценка индекса метилирования двух генов (*RARB2*, *RASSF1A*) как в циркулирующих ДНК плазмы, так и в циркулирующих ДНК, связанных с клеточной поверхностью, позволяет повысить чувствительность и специфичность дискриминирования рака легкого по сравнению с отдельным использованием указанных маркеров. Впервые выявлена ассоциация повышения концентрации эпигенетических маркеров (*RARB2*, *RASSF1A*, комбинации *RARB2+RASSF1A*) с уровнем белкового онкомаркера РЭА в крови больных раком легкого и отсутствие ассоциации с уровнем CYFRA 21-1. Показано, что анализ индекса метилирования генов *RASSF1A* и *RARB2* одновременно с определением концентрации белкового маркера CYFRA 21-1 позволяет отличить больных раком легкого от здоровых лиц с чувствительностью 94%, что превышает данный показатель при независимом

определении эпигенетических (90%) и белковых (57%) маркеров.

**Теоретическая и практическая значимость:** Сравнительный анализ эпигенетического статуса генов опухолевой супрессии *RARB2*, *RASSF1A*, концентрации и соотношения фрагментов гена *ACTB*, *LINE-1* повторяющихся элементов во фракциях циркулирующей ДНК (связанной с клеточной поверхностью и в плазме крови) у здоровых лиц и пациентов дает новые знания об особенностях генерации и циркуляции внеклеточных нуклеиновых кислот при развитии патологических процессов в легких. Определение изменений статуса метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови при хронической обструктивной болезни легких, при злокачественных опухолях легкого на различных стадиях заболевания позволяет оценить значимость эпигенетического статуса гена как маркера ранних этапов злокачественной трансформации клеток и опухолевой прогрессии. Данные о повышении индекса метилирования генов *RARB2*, *RASSF1A* при прогрессировании заболевания и его снижении после проведенного лечения свидетельствуют о потенциальной возможности их использования для оценки эффективности терапии, раннего выявления рецидивов и прогноза клинического течения рака легкого.

**Положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. У больных хронической обструктивной болезнью и раком легких концентрация фрагментов однокопийного гена *ACTB* и повторяющихся элементов *LINE-1* в циркулирующих ДНК, связанных с клеточной поверхностью, статистически значимо снижается по сравнению со здоровыми донорами.
2. Индекс метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* в циркулирующих ДНК крови у больных раком легкого значимо повышается по сравнению со здоровыми лицами. Для гена *RARB2* характерно повышение уровня и индекса метилирования у больных хронической обструктивной болезнью легких по сравнению со здоровыми донорами.
3. Статус метилирования гена *RARB2* в циркулирующих ДНК крови коррелирует с распространенностью злокачественного процесса и неблагоприятным исходом у больных раком легкого. Индекс метилирования генов *RARB2*, *RASSF1A* в циркулирующих ДНК крови больных раком легкого снижается после проведенного лечения и вновь увеличивается у пациентов с клинически подтвержденным прогрессированием заболевания.

**Апробация работы:** Основные результаты диссертационной работы были представлены на: IV–VI региональных конференциях молодых ученых-онкологов им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2009-2011), Российско-Тайваньском форуме «Опыт и перспективы развития сотрудничества между российскими и тайваньскими учеными в области изучения молекулярно-генетических механизмов развития злокачественных новообразований и использования результатов фундаментальных исследований в онкологии» (Томск, 2009), VI, VII международных конференциях «Циркулирующие нуклеиновые кислоты в плазме и сыворотке» (Гонконг, Китай, 2009; Мадрид,

Испания, 2011), международной конференции «Опухоль и организм: новые аспекты старой проблемы» (Киев, Украина, 2010), научной конференция «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2010), научной конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2011» (Санкт-Петербург, 2011), всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Инноватика-2011» с элементами научной школы для молодежи (Томск, 2011), II международной конференции «Физико-химическая биология» (Новосибирск, 2011), 21-ом ежегодном конгрессе Европейского Общества Респираторной Медицины (Амстердам, Нидерланды, 2011), научной конференции «Актуальные вопросы онкогенетики» (Москва, 2011), IX научной конференции «Генетика человека и патология: Актуальные проблемы современной цитогенетики» (Томск, 2011).

**Публикации:** По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе 4 статьи в журналах Перечня ведущих рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**Структура и объем диссертации:** Диссертационная работа изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, заключения и выводов. Данные проиллюстрированы 16 таблицами, 9 рисунками. Библиографический список включает 164 источника, из них 18 работ отечественных авторов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В исследование включено 60 больных с морфологически верифицированным диагнозом «немелкоклеточный рак легкого» (НМРЛ: 36 – плоскоклеточный рак легкого, ПКРЛ, 24 – аденокарцинома, АК), в возрасте от 40 до 70 лет ( $55,0 \pm 6,4$  лет), со стадией опухолевого процесса  $T_{1-3}N_{0-3}M_0$ , находившихся на лечении в клинике НИИ онкологии СО РАМН с 2005 по 2009 годы. Все больные получали комбинированное лечение, включавшее 2 курса неoadьювантной химиотерапии и последующее хирургическое вмешательство с интраоперационной лучевой терапией (ИОЛТ) на фоне радиосенсибилизации. Материалом для исследования служила венозная кровь, которая забиралась до лечения, на 10-15-е сутки после операции и затем каждые 3 месяца в процессе динамического наблюдения пациента. В группу сравнения включено 22 больных ХОБЛ в возрасте от 33 до 63 лет, ( $52,5 \pm 6,1$ ). В контрольную выборку включено 33 практически здоровых мужчин в возрасте от 35 до 60 лет ( $47,5 \pm 5,5$ ). Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288). Получено разрешение этического комитета НИИ онкологии СО РАМН.

Венозную кровь собирали в 0,05М раствор ЭДТА в фосфатно-солевом буфере (соотношение крови и ЭДТА 1:5). Образцы крови разделяли на плазму и клетки крови, фракцию скп-цирДНК получали последовательной обработкой клеток 5мМ фосфатным буфером и 0,25% раствором трипсина, как описано

ранее (Tamkovich et al., 2005). ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 6 мл ФБ-ЭДТА и 2 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). Концентрация однокопийного гена *ACTB* и *LINE-1* повторов определялась методом количественной ПЦР в режиме реального времени (Morozkin et al., 2008; Skvortsova et al., 2008). Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.». Концентрацию метилированных и неметилированных аллелей генов опухолевой супрессии *RARB2* и *RASSF1A* в циркулирующих ДНК крови определяли с использованием количественной метил-специфичной ПЦР (Fackler et al., 2004, Skvortsova et al., 2008). Индекс метилирования вычисляли по формуле  $ИМ (\%) = 100 \times (\text{число метилированных аллелей гена} / (\text{число метилированных} + \text{число неметилированных аллелей}))$  для цирДНК плазмы и скп-цирДНК (Chun et al., 2004). Концентрацию белковых маркеров в плазме крови исследовали иммуноферментным анализом при помощи коммерческих наборов: РЭА («Вектор-Бест», Россия), CYFRA 21-1 («DRG Enzyme Immunoassay Kit», Германия), согласно инструкциям от производителя. Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ «Statistica for Windows 6.0» и «MedCalc 9.5.2.0». Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение и среднюю ошибку. Статистические различия оценивали с использованием критерия Манна-Уитни, для оценки различий групп по качественным признакам – одностороннего критерия Фишера. Ассоциацию исследуемых показателей с выживаемостью пациентов оценивали посредством построения кривых общей выживаемости с использованием метода Каплан-Майера. Чувствительность и специфичность маркеров оценивалась с помощью ROC-анализа («MedCalc software»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Количественный анализ фрагментов гена *ACTB* и *LINE-1* повторов цирДНК крови у больных ХОБЛ и РЛ.** По данным ПЦР-анализа фрагментов гена *ACTB* и *LINE-1* повторов концентрация цирДНК в плазме здоровых не отличается от концентрации цирДНК в плазме больных НМРЛ. При этом показано, что при НМРЛ количество скп-цирДНК значительно снижается ( $p=0,01$  – *ACTB* и  $p=0,002$  – *LINE-1*, соответственно). Впервые обнаружено, что среднее значение концентрации скп-цирДНК крови у больных ХОБЛ ниже по сравнению со здоровыми донорами ( $p=0,04$  – *ACTB* и  $p=0,001$  – *LINE-1*), для цирДНК плазмы значимых различий не выявлено (табл. 1). Показано, что снижение концентрации *LINE-1* элементов в скп-цирДНК происходит на более ранних стадиях РЛ по сравнению с концентрацией *ACTB*. Согласно данным ROC-анализа для определения чувствительности и специфичности дискриминирования больных РЛ и здоровых доноров выбрано оптимальное пороговое значение концентрации 220 нг/мл крови – *ACTB*, 109 нг/мл крови – *LINE-1*. Для этих значений оценка концентрации цирДНК по *ACTB* во фракции, связанной с клеточной поверхностью, позволяет с чувствительностью 77% и



специфичностью 60% отличить больных НМРЛ от здоровых доноров, по *LINE-1* – 75% и 71%, соответственно.

Таблица 1 – Концентрация цирДНК в крови здоровых доноров, больных ХОБЛ и НМРЛ по данным ПЦР-анализа фрагментов *ACTB* и *LINE-1*

	Здоровые доноры		Больные ХОБЛ		Больные НМРЛ	
	Концентрация цирДНК, нг/мл крови*					
	1	2	1	2	1	2
<i>ACTB</i>	14±4	294±56**	13±3	140±42	10±5	163±20
<i>LINE-1</i>	12±7	171±28**	8±2	65±14	9±3	47±9

*Примечание:* 1 – плазма крови; 2 – фракция, связанная с клеточной поверхностью; \* – представлены среднее значение и средняя ошибка; \*\* – различия статистически значимы с группой больных ХОБЛ и НМРЛ, в цирДНК, связанных с клеточной поверхностью.

Определяли соотношение количества фрагментов делением значения концентрации фрагментов гена *ACTB* на значение концентрации *LINE-1* повторов в крови. Установлено, что в плазме крови соотношение концентраций фрагментов гена *ACTB* и *LINE-1* элементов у больных НМРЛ по сравнению с больными ХОБЛ (1,6 против 2,1,  $p=0,07$ ) и по сравнению со здоровыми донорами (1,6 против 1,9,  $p=0,07$ ) значимо не отличается. При этом в скп-цирДНК соотношение концентраций фрагментов гена *ACTB* к *LINE-1* элементам у больных НМРЛ статистически значимо выше, чем у больных ХОБЛ (3,4 против 1,5,  $p=0,01$ ) и выше, чем у здоровых лиц (3,4 против 1,7,  $p=0,01$ ). Выявление изменений в соотношении концентраций фрагментов гена *ACTB* к *LINE-1* повторам в скп-цирДНК крови позволяет предполагать, что при раке легкого происходит усиление процессов, приводящих к неравномерной представленности в составе циркулирующих ДНК фрагментов ДНК генома, соответствующих районам активного эухроматина (ген *ACTB*), и неактивным участкам конститутивного гетерохроматина (*LINE-1* повторы).

**Исследование уровня метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови у больных ХОБЛ и РЛ.** Уровень метилирования гена определяли по количеству метилированных аллелей в 1 мл исходного образца крови. Количественный анализ неметилированных аллелей исследуемого гена показал, что их накопление и распределение между плазмой и связанной с клетками фракцией отличается от характера изменений концентрации метилированных аллелей. Показано, что концентрация неметилированных аллелей гена *RARB2* в скп-цирДНК значимо повышалась (в 1,6 раза у больных НМРЛ и в 1,8 раз у больных ХОБЛ) по сравнению со здоровыми донорами, однако не так значительно, как концентрация метилированных аллелей (в 7 раз у больных НМРЛ и в 4,5 раза у больных ХОБЛ). В цирДНК плазмы концентрация неметилированных аллелей гена *RARB2* не изменялась, тогда как, концентрация метилированных аллелей увеличивалась в 3 раза у больных НМРЛ. Средний

уровень метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы и скп-цирДНК выше у больных с III стадией по сравнению с больными I-II стадии заболевания (табл. 2).

Таблица 2 – Уровень метилирования гена *RARB2* в цирДНК у больных ХОБЛ, НМРЛ и здоровых доноров

Группа	n	Скп-цирДНК*	p	ЦирДНК плазмы крови*	p
Здоровые доноры	32	1057±211 (М) 8856±1427 (У)	0,003 (М)	1035±198 (М) 5381±1597 (У)	0,006 (М)
НМРЛ (общая группа)	55	7524±939 (М) 13812±2225 (У)	0,023 (У)	3614±323 (М) 3496±989 (У)	0,03 (У)
ХОБЛ	22	4853±606 (М) 15939±1989 (У)	0,02 <sup>a</sup> (М) 0,1 <sup>a</sup> (У); 0,005 <sup>b</sup> (М) 0,012 <sup>b</sup> (У)	3015±270 (М) 3913±326 (У)	0,08 <sup>a</sup> (М) 0,78 <sup>a</sup> (У); 0,007 <sup>b</sup> (М) 0,90 <sup>b</sup> (У)
ПКРЛ	36	5218±848 (М) 9413±2826 (У)	0,02 (М)	3713±749 (М) 3245±776 (У)	0,13 (М)
АК	19	8102±1053 (М) 13765±2598 (У)	0,03 (У)	3524±361 (М) 2845±975 (У)	0,12 (У)
I-II стадии заболевания	20	3917±366 (М) 10434±2318 (У)	0,009 (М)	2537±447 (М) 2421±399 (У)	0,011 (М)
III стадия заболевания	35	8986±1081 (М) 12463±2864 (У)	0,11 (У)	4521±446 (М) 4115±406 (У)	0,012 (У)

*Примечание:* М и У – метилированные и неметилированные аллели гена соответственно; n – количество человек в группе; p – уровень значимости; \* – концентрация метилированных и неметилированных аллелей гена *RARB2* (копии/мл крови), представлены среднее значение и средняя ошибка; а – различия статистически значимы по сравнению с группой больных НМРЛ, б – с группой здоровых доноров.

Для оценки возможной связи уровня метилирования гена опухолевой супрессии *RARB2* в цирДНК крови с исходом был проведен однофакторный анализ общей выживаемости больных НМРЛ (n=51) в зависимости от порогового уровня метилирования по методу Каплана-Майера (рис. 1). У больных РЛ, имеющих уровень метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы крови ниже порогового значения, показатели общей двухлетней выживаемости были значимо выше по сравнению с больными, имеющими уровень метилирования более 3614 коп/мл крови (p=0,01, логарифмически-ранговый критерий). Статистически значимых различий общей выживаемости в зависимости от концентрации метилированных аллелей гена *RARB2* в скп-цирДНК не было обнаружено.

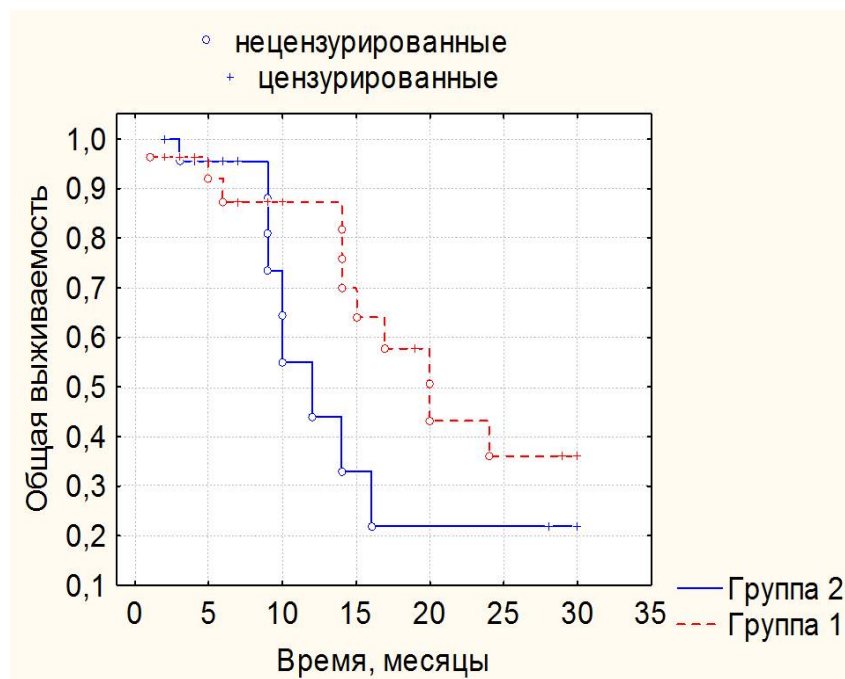


Рис. 1 – Общая выживаемость больных НМРЛ в зависимости от порогового уровня метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы. **Нецензурированные данные** – завершенные наблюдения, в которых наступил случай смерти или прогрессирование опухолевого процесса (метастазы, рецидивы); **цензурированные данные** – незавершенные наблюдения, в которых не наблюдались случаи прогрессирования, пациент жив или выбыл и больше не наблюдался. **Группа 1** – пороговый уровень метилирования гена ниже 3614 копий/мл и **группа 2** – пороговый уровень метилирования выше 3614 копий/мл.

С целью определения информативности изучаемого показателя для оценки эффективности комбинированного лечения, мы провели сравнительный анализ уровня метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови 43 больных НМРЛ до лечения и на 10-15-е сутки после операции. В 93% (40/43) случаев уровень метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы и скп-цирДНК после удаления опухоли снижался по сравнению с уровнем до лечения и составил в среднем  $439 \pm 52$  копий/мл против  $3614 \pm 323$  копий/мл – в цирДНК плазмы и  $547 \pm 62$  копий/мл против  $7524 \pm 939$  копий/мл – в скп-цирДНК ( $p < 0,001$ , критерий Манна-Уитни).

**Определение индекса метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови у больных ХОБЛ и РЛ.** Проведен сравнительный анализ индекса метилирования гена *RARB2* в норме и при патологиях легкого, который является интегральной характеристикой статуса метилирования гена в цирДНК крови. Значение индекса метилирования отражает процентное содержание метилированных аллелей гена относительно общего количества аллелей (метилированных и неметилированных) гена в цирДНК. Определение индекса метилирования позволяет отличать специфическое увеличение количества метилированных

аллелей гена, связанное с ростом опухоли, от неспецифического увеличения их количества, связанного с общим увеличением концентрации цирДНК при других патологических состояниях. В настоящей работе выявлено статистически значимое повышение индекса метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы и в скп-цирДНК у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми донорами (табл. 3).

Таблица 3 – Индекс метилирования гена *RARB2* в цирДНК у больных ХОБЛ, НМРЛ и здоровых доноров

Группа	n	Скп-цирДНК*	p	ЦирДНК плазмы крови*	p
Здоровые доноры	32	11±2	0,0002	17±2	<0,001
НМРЛ (общая группа)	55	35±4		51±4	
ХОБЛ	22	23±4	0,04 <sup>a</sup> 0,01 <sup>б</sup>	43±5	0,19 <sup>a</sup> <0,001 <sup>б</sup>
ПКРЛ	36	36±4	0,82	53±5	0,65
АК	19	37±6		55±6	
I-II стадии заболевания	20	27±4	0,03	51±5	0,83
III стадия заболевания	35	42±6		52±5	

*Примечание:* \* – индекс метилирования гена *RARB2* (%), представлены среднее значение и средняя ошибка; другие обозначения см. в табл. 2.

Согласно данным ROC-анализа для определения чувствительности и специфичности дискриминирования больных РЛ и здоровых доноров выбрано оптимальное пороговое значение индекса метилирования гена в скп-цирДНК – 27%, в цирДНК плазмы крови – 36%. Для этих значений оценка индекса метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы и фракции, связанной с поверхностью клеток крови, позволяет с чувствительностью 79% и специфичностью 70% отличить больных РЛ от здоровых доноров. При дискриминации больных НМРЛ от больных ХОБЛ чувствительность и специфичность составила 75% и 70%, соответственно (при пороговом значении индекса метилирования гена в скп-цирДНК – 23% и в цирДНК плазмы крови – 43%).

Установлена связь индекса метилирования гена *RARB2* в цирДНК со стадией заболевания. У больных НМРЛ III стадии индекс метилирования гена *RARB2* в скп-цирДНК значимо выше, чем у больных НМРЛ I-II стадии (табл. 3). Выявлено значимое повышение индекса метилирования гена *RARB2* в скп-цирДНК в следующем ряду: здоровые доноры – больные ХОБЛ – больные НМРЛ. В цирДНК плазмы статистически значимые различия выявлены как у больных ХОБЛ, так и у больных НМРЛ по сравнению со здоровыми донорами (табл. 3). Так же, как уровень метилирования, индекс метилирования гена *RARB2* в цирДНК после удаления опухоли снижался по сравнению с его значениями до лечения и составил 36±4% против 51±4% – в цирДНК плазмы и

12±2% против 35±4% – в скп-цирДНК ( $p=0,004$  и  $p=0,000004$  соответственно, критерий Манна-Уитни).

**Определение индекса метилирования гена *RASSF1A* в цирДНК крови у больных ХОБЛ и РЛ.** Проведен сравнительный анализ индекса метилирования гена *RASSF1A* в цирДНК крови с использованием метода «двухраундовой» количественной ПЦР (Fackler et al., 2004). Выявлено значимое повышение индекса метилирования гена *RASSF1A* в цирДНК плазмы и скп-цирДНК у больных НМРЛ до начала лечения по сравнению с больными ХОБЛ и здоровыми донорами (табл. 4).

Таблица 4 – Индекс метилирования гена *RASSF1A* в цирДНК у больных ХОБЛ, НМРЛ и здоровых доноров

Группа	n	Скп-цирДНК*	p	ЦирДНК плазмы крови*	p
Здоровые доноры	32	19±3	0,0006	21±3	0,001
НМРЛ (общая группа)	55	39±4		45±7	
ХОБЛ	22	18±3	0,0006 <sup>a</sup> 0,80 <sup>b</sup>	27±4	0,001 <sup>a</sup> 0,67 <sup>b</sup>
ПКРЛ	36	38±5	0,97	44±5	0,95
АК	19	39±7		46±7	
I-II стадии заболевания	20	39±5	0,83	41±5	0,42
III стадия заболевания	35	37±5		47±6	

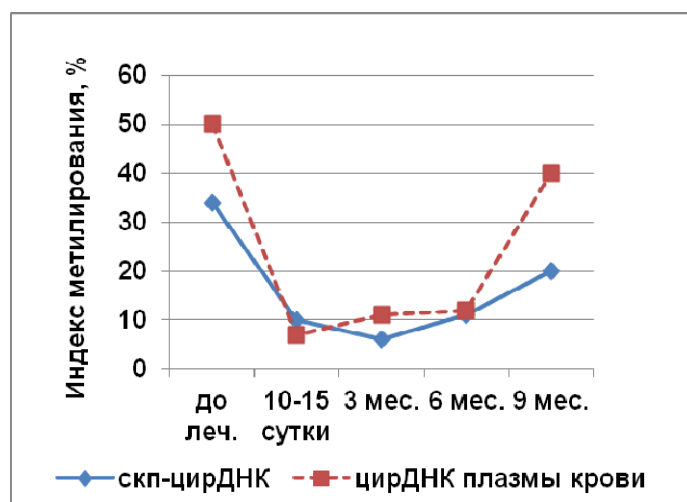
*Примечание:* \* – индекс метилирования гена *RASSF1A* (%), представлены среднее значение и средняя ошибка; другие обозначения см. в табл. 2.

Согласно данным ROC-анализа оценка индекса метилирования гена *RASSF1A* в цирДНК плазмы и фракции, связанной с поверхностью клеток крови, позволяет с чувствительностью 83% и специфичностью 74% отличить больных РЛ от здоровых доноров (при пороговом значении 29% в скп-цирДНК и 36% в цирДНК плазмы крови). При дискриминации больных НМРЛ от больных ХОБЛ чувствительность и специфичность составила 75% и 70% (при пороговом значении 18% в скп-цирДНК и 27% в цирДНК плазмы).

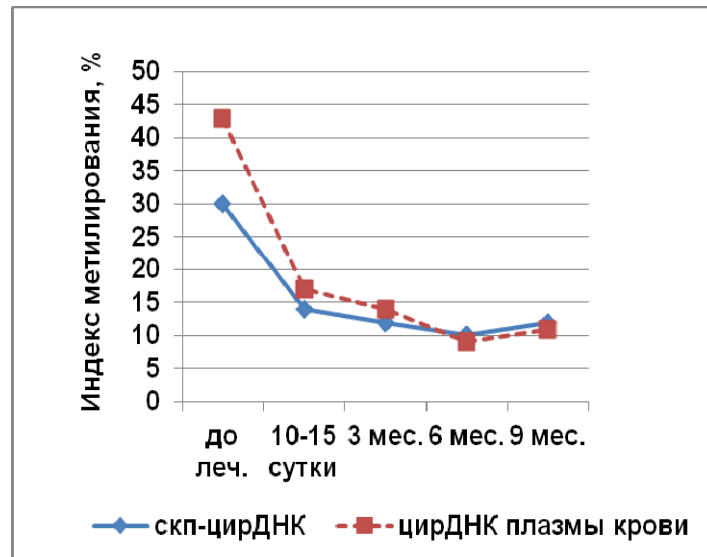
Ассоциации между индексом метилирования гена *RASSF1A* в пуле цирДНК крови (скп-цирДНК и цирДНК плазмы) и распространенностью опухолевого процесса не выявлено (табл. 4). В 90% (39/43) случаев индекс метилирования гена *RASSF1A* в цирДНК плазмы и скп-цирДНК после удаления опухоли снижался по сравнению с его значениями до лечения и составил в цирДНК плазмы 20±5% против 45±7% и в скп-цирДНК 14±3% против 39±4% ( $p=0,03$  и  $p=0,01$ , критерий Манна-Уитни).

**Анализ ассоциации повышенного уровня метилированных аллелей генов *RARB2* и *RASSF1A* и белковых онкомаркеров (РЭА и *CYFRA 21-1*).** Иммунохимическая детекция белковых маркеров РЭА и *CYFRA 21-1* позволяет дискриминировать больных НМРЛ от здоровых доноров с чувствительностью 43% и 56% и специфичностью 88% и 97%. Одновременный анализ уровней РЭА и *CYFRA 21-1* практически не дает повышения чувствительности (57%) и приводит к некоторому снижению специфичности (до 92%). Выявлена ассоциация между концентрациями эпигенетических и белковых маркеров в крови больных НМРЛ. Показано, что повышение индекса метилирования одного гена (*RARB2* или *RASSF1A*) или одновременно двух генов (*RARB2* и *RASSF1A*) ассоциировано с увеличением концентрации белкового маркера РЭА и не ассоциировано с уровнем *CYFRA 21-1*. Установлено, что анализ комбинации концентрации эпигенетических маркеров (метилированные аллели генов *RARB2*, *RASSF1A*) и белкового маркера *CYFRA 21-1* позволяет отличить больных НМРЛ от здоровых лиц с чувствительностью 94% и специфичностью 86%.

**Исследование уровня эпигенетических (*RARB2*, *RASSF1A*) и белковых (РЭА) онкомаркеров в крови больных НМРЛ на этапах динамического наблюдения.** Проведено исследование количественных изменений эпигенетических и белковых маркеров в крови больных (n=26) на этапах мониторинга через 3, 6 и 9 месяцев после комбинированного лечения. Показано, что у больных НМРЛ с признаками прогрессии заболевания (выявленными клинически через 9 месяцев после лечения) наблюдается повышение концентрации метилированных аллелей генов *RARB2* и *RASSF1A* в 100% (5/5) случаев (рис. 2). Увеличение уровня белкового маркера РЭА выявлено только в 40% случаев (2/5). Полученные данные говорят о том, что анализ эпигенетических маркеров (метилированные аллели генов *RARB2*, *RASSF1A*) может быть более информативным по сравнению с определением концентрации белкового маркера РЭА для выявления ранних признаков прогрессирования после лечения больных НМРЛ.



А



**Б**

Рис. 2 – Пример анализа характера изменений индекса метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови у больных НМРЛ. **А** - показатели пациента N в случае прогрессирования заболевания (рецидивы, отдаленные метастазы); **Б** – показатели пациента F в случае отсутствия признаков прогрессирования заболевания.

### Заключение

В данной работе проведен анализ эпигенетического статуса генов опухолевой супрессии *RARB2*, *RASSF1A*, концентрации и характера распределения фрагментов однокопийного гена *ACTB*, *LINE-1* повторов в циркулирующих ДНК крови у больных хронической обструктивной болезнью, раком легких и здоровых лиц.

Выявлено преобладание фрагментов гена *ACTB* над *LINE-1* повторами в скуп-цирДНК крови у больных НМРЛ по сравнению с больными ХОБЛ и здоровыми донорами. Показано, что изменение концентрации *LINE-1* повторов в скуп-цирДНК происходит на более ранних стадиях РЛ по сравнению с концентрацией *ACTB*. Поэтому анализ концентрации *LINE-1* является перспективным для разработки метода детекции первичных опухолей, тогда как анализ соотношения концентраций *LINE-1* повторов и *ACTB* может служить дополнительным фактором дискриминации доброкачественного (ХОБЛ) и опухолевого процессов.

Показано значимое увеличение уровня и индекса метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* во фракциях цирДНК крови у больных ХОБЛ и РЛ по сравнению со здоровыми донорами. Повышенный уровень метилирования гена *RARB2* в крови ассоциирован со стадией заболевания и неблагоприятным исходом, что свидетельствует об участии эпигенетических нарушений гена в прогрессии заболевания и их потенциальной значимости как маркера прогноза клинического течения. После проведения комбинированной терапии

наблюдалось снижение индекса метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* в цирДНК крови и повторное по

вышение индекса при клинических проявлениях прогрессии, что говорит о возможности рассматривать данный показатель в качестве одного из индикаторов наличия опухоли.

Отсутствие значимой ассоциации между индексом метилирования одного гена (*RARB2* или *RASSF1A*) либо двух генов (*RARB2* и *RASSF1A*) и концентрацией белкового маркера CYFRA 21-1 позволяет предполагать, что эти показатели могут быть использованы в качестве независимых, дополняющих друг друга маркеров, отражающих разные стороны патогенеза рака легкого. Полученные данные являются обоснованием целесообразности использования комбинации эпигенетических и белковых маркеров для повышения чувствительности диагностики и прогноза клинического течения рака легкого. Кроме того, перспективным представляется использование анализа изученных в работе эпигенетических маркеров в цирДНК крови с целью оценки эффективности проводимого лечения и на этапах динамического наблюдения для раннего выявления рецидива.

## ВЫВОДЫ

1. Концентрация фрагментов однокопийного гена *ACTB* и повторяющихся элементов *LINE-1* в цирДНК крови, связанных с клеточной поверхностью, статистически значимо ниже у больных хронической обструктивной болезнью легких ( $140 \pm 42$  нг/мл – *ACTB*,  $65 \pm 14$  нг/мл – *LINE-1*) и больных раком легкого ( $163 \pm 20$  нг/мл – *ACTB*,  $47 \pm 9$  нг/мл – *LINE-1*), чем у здоровых доноров ( $294 \pm 56$  нг/мл – *ACTB*,  $171 \pm 28$  нг/мл – *LINE-1*) ( $p < 0,05$ ).
2. У больных раком легкого выявлено существенное увеличение уровня метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,05$ ). В цирДНК, связанных с клеточной поверхностью, уровень метилирования гена *RARB2* повышается в ряду здоровые доноры ( $1057 \pm 211$  копий/мл) – больные хронической обструктивной болезнью легких ( $4853 \pm 606$  копий/мл) – больные раком легкого ( $7524 \pm 939$  копий/мл) ( $p < 0,05$ ).
3. Индекс метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* в цирДНК крови существенно увеличивается у больных раком легкого по сравнению с больными хронической обструктивной болезнью легких и здоровыми донорами ( $p < 0,05$ ).
4. У больных раком легкого III стадии уровень и индекс метилирования гена *RARB2* в цирДНК крови статистически значимо выше, чем у больных I-II стадий ( $p < 0,05$ ). Снижение концентрации повторяющихся элементов *LINE-1* в цирДНК, связанных с клеточной поверхностью, происходит на более ранних стадиях рака легкого по сравнению с концентрацией фрагментов однокопийного гена *ACTB*.
5. У больных раком легкого, имеющих уровень метилирования гена *RARB2* в цирДНК плазмы крови ниже порогового значения (3614 копий/мл крови), показатели общей двухлетней выживаемости значимо выше по сравнению



с больными, имеющими уровень метилирования более 3614 копий/мл крови ( $p=0,01$ ).

6. Индекс метилирования генов *RARB2* и *RASSF1A* в циркулирующей ДНК крови после удаления опухоли статистически значимо снижается по сравнению с показателями до лечения. У больных раком легкого повышение концентрации метилированных аллелей одного или двух генов (*RARB2* и/или *RASSF1A*) в процессе мониторинга после лечения сопряжено с выявлением клинических признаков прогрессирования заболевания.
7. Повышение индекса метилирования одного гена (*RARB2* или *RASSF1A*) или одновременно двух генов (*RARB2* и *RASSF1A*) ассоциировано с увеличением концентрации белкового маркера РЭА в крови больных раком легкого ( $p<0,05$ ), для CYFRA 21-1 такой ассоциации не выявлено. Анализ индекса метилирования генов *RASSF1A*, *RARB2* одновременно с определением концентрации белкового маркера CYFRA 21-1 позволяет повысить чувствительность дискриминирования рака легкого с 57 до 94%.

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Пономарева А.А.,** Е.Ю. Рыкова, Н.В. Чердынцева, Скворцова Т.Е., Добродеев А.Ю., Литвяков Н.В., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Анализ уровня метилирования гена *RARB2* в циркулирующей ДНК крови у больных раком легкого как потенциального прогностического маркера // Вопросы онкологии. 2011. Т. 57, № 3. С. 302-307.
2. **Пономарева А.А.,** Е.Ю. Рыкова, Н.В. Чердынцева, Чойнзонов Е.Л., Лактионов П.П., Власов В.В. Молекулярно-генетические маркеры в диагностике рака легкого // Молекулярная биология. 2011. Т. 45, № 2. С. 203-217.
3. **Пономарева А.А.,** Е.Ю. Рыкова, Н.В. Чердынцева, Скворцова Т.Е., Добродеев А.Ю., Литвяков Н.В., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Сравнительный анализ эпигенетических и белковых маркеров в крови больных немелкоклеточным раком легкого // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 5. С. 40-45.
4. **Ponomaryova A.A.,** Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. *RARB2* gene methylation level in the circulating DNA from blood of patients with lung cancer // Eur. J. Cancer Prev. 2011. Vol. 20. P. 453-455.
5. **Ponomaryova A.A.,** Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Cherepanova A.V., Morozkin E.S., Mileiko V.A., Litvjakov N.V., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Chikova E.D., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Concentration and distribution of single-copy *ACTB* gene and *LINE-1* repetitive elements in blood of lung cancer patients // Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum / In: Gahan P.B., editor. United Kingdom: Springer, 2011. P. 41-45.
6. **Пономарева А.А.,** Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Е., Чердынцева Н.В., Добродеев А.Ю., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Анализ

уровня метилирования гена *RARB2* в крови как потенциального диагностического маркера при раке легкого // Молекулярная диагностика. Сб. трудов/колл. авт., под. ред. В.И. Покровского. Т. 4. М.: Киселева Н.В., 2010. С. 109-111.

7. **Пономарева А.А.**, Е.Ю. Рыкова, Н.В. Скворцова Т.Э., Черепанова А.В., Морозкин Е.С., Милейко В.А., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П., Чердынцева Н.В. Анализ внеклеточных ДНК крови методом ПЦР в режиме реального времени при диагностике рака легкого // Материалы Сибирско-Тайваньского форума. Томск, 2009. С. 121-123.
8. Rykova E.Yu, **Ponomaryova A.A.**, Skvortsova T.E, Cherepanova A.V, Morozkin E.S, Mileiko V.A, Dobrodeev A.Yu, Zav'yalov A.A, Tuzikov S.A, Vlassov V.V, Cherdyntseva N.V, Laktionov P.P. Circulating DNA quantification using real-time PCR in lung cancer // Proceeding of 6<sup>th</sup> International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-VI). Hong Kong, 2009. P. 65.
9. **Пономарева А.А.**, Скворцова Т.Э., Черепанова А.В., Добродеев А.Ю. Концентрация связанных с поверхностью клеток крови циркулирующих ДНК как прогностический фактор при раке легкого // Материалы IV региональной конференции молодых ученых им. Академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 2009. С. 161-162.
10. **Пономарева А.А.**, Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю., Лактионов П.П., Чердынцева Н.В. Циркулирующая дезоксирибонуклеиновая кислота как прогностический фактор при немелкоклеточном раке легкого // Материалы российской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы современной онкологии». Барнаул, 2009. С. 226-227.
11. **Пономарева А.А.**, Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Черепанова А.В., Морозкин Е.С., Милейко В.А., Литвяков Н.В., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П., Чердынцева Н.В. Определение количества внеклеточных ДНК крови методом ПЦР, специфичной к *ACTB* и *LINE-1* последовательностям при раке легкого // Материалы Российской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию НИИ онкологии СО РАМН «Современная онкология: достижения и перспективы развития». Томск, 2009. С. 160-161.
12. **Ponomaryova A.A.**, Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Circulating methylated DNA as a diagnostic marker in lung cancer // Proceeding of International conference «Tumor and host: novel aspects of old problem». Kyiv, 2010. P. 56.
13. **Пономарева А.А.**, Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю. Анализ статуса метилирования гена опухолевой супрессии *RARB2* в циркулирующих ДНК крови при раке легкого // Материалы V региональной конференции

молодых ученых им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 2010. С. 85.

14. **Пономарева А.А.**, Е.Ю. Рыкова, Н.В. Чердынцева, Скворцова Т.Е., Добродеев А.Ю., Литвяков Н.В., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Анализ статуса метилирования гена опухолевой супрессии *RARB2* в крови как потенциального маркера при раке легкого // Материалы научной конференции «Фундаментальные науки – медицине». Новосибирск, 2010. С. 74.
15. **Пономарева А.А.**, Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Е., Чердынцева Н.В., Добродеев А.Ю., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Исследование уровня метилирования гена онкосупрессора *RARB2* в циркулирующих ДНК крови при раке легкого // Материалы VI съезда онкологов и радиологов стран СНГ. Душанбе, 2010. С. 72-73.
16. **Пономарева А.А.**, Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю. Анализ статуса метилирования гена *RARB2* в крови больных раком легкого для оценки эффективности проведенной комбинированной терапии // Материалы VI региональной конференции молодых ученых им. академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 2011. С. 94-95.
17. **Пономарева А.А.**, Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В., Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Уровень метилирования гена *RARB2* в циркулирующих ДНК как потенциальный фактор прогноза при раке легкого // Материалы 7-й российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения-2011». Санкт-Петербург, 2011. С. 52-53.
18. **Ponomaryova A.A.**, Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. *RARB2* methylation level in blood for lung cancer assessment // Abstracts Book of 21<sup>st</sup> Annual Congress. Amsterdam, 2011. P. 339s.
19. **Пономарева А.А.**, Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В., Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П. Оценка статуса метилирования генов опухолевой супрессии *RASSF1A* и *RARB2* в циркулирующих ДНК крови у больных немелкоклеточным раком легкого // Материалы II международной конференции «Физико-химическая биология». Новосибирск, 2011. С. 72.
20. **Ponomaryova A.A.**, Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Methylation status of *RASSF1A* and *RARB2* genes in the circulating DNA from lung cancer patients' blood // Proceedings of 7<sup>th</sup> International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS VII), Madrid, 2011. P. 21.
21. Rykova E.Y., Morozkin E.S., Loseva E.M., **Ponomaryova A.A.**, Elistratova E.V., Mileiko V.H., Cherepanova A.V., Skvortsova T.E., Bryzgunova O.E., Tamkovich S.N., Cherdyntseva N.V., Vlassov V.V., Laktionov P.P. Cell-free

and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content // Proceedings of 7<sup>th</sup> International Conference on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS VII), Madrid, 2011. P. 3.

22. **Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В., Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю., Литвяков Н.В., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П.** Оценка информативности эпигенетических и белковых маркеров в крови для диагностики немелкоклеточного рака легкого // Материалы научной конференции «Актуальные вопросы онкогенетики». Москва, 2011. С. 19-20.
23. **Пономарева А.А., Е.Ю. Рыкова, Н.В. Чердынцева, Скворцова Т.Э., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П.** Анализ эпигенетических и белковых онкомаркеров в крови больных немелкоклеточным раком легкого // Сб. трудов IX научной «Генетика человека и патология: Актуальные проблемы современной цитогенетики». Томск, 2011. С. 124-125.
24. **Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В., Скворцова Т.Э., Морозкин Е.С., Добродеев А.Ю., Завьялов А.А., Тузиков С.А., Власов В.В., Лактионов П.П.** Анализ ДНК-маркеров рака легкого в метагеноме крови // Материалы II международной научно-практической конференции в рамках программы СО РАН «Геномика, протеомика, биоинформатика». Новосибирск, 2011. С. 67.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

АК – аденокарцинома

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого

РЛ – рак легкого

РЭА – раковый эмбриональный антиген

скп-цирДНК – связанные с клеточной поверхностью циркулирующие ДНК

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

цирДНК – циркулирующие ДНК

CYFRA 21-1 – фрагмент цитокератина 19

n – количество человек

p – уровень значимости

Подписано к печати 30.01.2012. Тираж 100 экз.  
Кол-во стр. 20. Заказ № 03-12  
Бумага офсетная. Формат А-5. Печать RISO  
Отпечатано в типографии ООО «РауШ мбх»  
Лицензия Серия ПД № 12-0092 от 03.05.2001г.  
634034, г. Томск, ул. Усова 7, ком. 046  
тел. (3822) 56-44-54