

*На правах рукописи*

**РЫКОВ СЕРГЕЙ ВИКТОРОВИЧ**

**Гены микроРНК, подверженные метилированию в  
опухолях легкого и толстой кишки, и их  
диагностическое значение**

**03.01.03 "Молекулярная биология"**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Москва - 2013**

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»)

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук, профессор,  
ФГУП «ГосНИИ генетика», г. Москва

Брага Элеонора Александровна

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор,  
ФГБУН «Институт биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова» РАН, г. Москва

Лебедев Юрий Борисович

Доктор биологических наук, профессор,  
ФГБУН «Институт молекулярной  
генетики» РАН, г. Москва

Сломинский Петр Андреевич

**Ведущая организация:**

ФГБУН «Институт биологии  
гена» РАН, г.Москва

Защита состоится «28» мая 2013 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.217.013.01 при Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов по адресу: 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1.

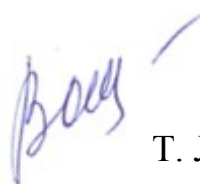
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика».

Реферат разослан « » апреля 2013 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат химических наук, доцент



Т. Л. Воюшина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В развитых странах онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности, сменив инфекционные заболевания. Рак легкого стоит на третьем месте по заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей, как в мире, так и в России (*Мукерия и Заридзе, 2010*). На немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) приходится 85-87% всех мировых случаев выявления новообразований. Пятилетняя выживаемость при диагностике на I-II стадии составляет 57-67%, на III - 5-25% и на IV - менее 1%.

Рак толстой кишки (РТК) в России является чрезвычайно насущной проблемой, занимая четвертое место в структуре женской онкологической заболеваемости (~10 % в 2011 году в России) и пятое место (5.8% в 2011 году в России) в структуре мужской заболеваемости (*Чиссов и др., 2012*). Тяжесть заболевания и низкая выживаемость при раке толстой кишки связаны, прежде всего, с поздним выявлением опухоли. Так, при первичном обращении пациентов к врачу запущенные формы рака (III-IV стадии) диагностируются у 71% больных. Пятилетняя выживаемость больных РТК при выявлении заболевания на I стадии составляет 96%, на II - 87%, на III - 55% и на IV - только 5%.

Аномальное функционирование и измененный профиль экспрессии генов, контролирующих клеточный цикл, апоптоз и дифференцировку, являются ключевым свойством злокачественного процесса (*Hanahan and Weinberg, 2010*). Исследования последних лет показывают, что эпигенетические нарушения (метилирование ДНК и модификации гистонов), в совокупности с генетическими изменениями, составляют комплекс механизмов, ответственных за формирование фенотипа трансформированной клетки (*Godfrey et al., 2007*). Изменение степени метилирования ДНК происходит при различных патологиях и характерно для онкологических заболеваний, при которых на фоне глобального деметилирования генома происходит избирательное гиперметилирование промоторов генов, проявляющих опухоль-супрессорные свойства (*Jones and Baylin, 2007*).

МикроРНК относятся к классу малых некодирующих РНК длиной 19-24 нуклеотида, выполняющих функцию посттранскрипционного регулятора экспрессии целевых генов (*Макарова и Крамеров, 2007*). Показана важная роль дифференциальной экспрессии генов микроРНК в процессах злокачественной трансформации, причем профили экспрессии микроРНК носят опухоль-специфичный характер (*Melo and Esteller, 2011*).

Экспрессия генов микроРНК также подвержена регуляции посредством метилирования CpG-динуклеотидов в составе CpG-островков, перекрывающих промоторные участки генов (*Lopez-Serra and Esteller, 2012*). Следует отметить, что для генов микроРНК метилирование является более характерным эпигенетическим механизмом подавления экспрессии, чем для белок-кодирующих генов. Так, 11,5% всех генов микроРНК подвержены регуляции посредством метилирования (122 из 1048 генов микроРНК по состоянию на

2011 год), для белок-кодирующих генов этот показатель составляет 1-2% (Kunej et al., 2011).

**Цель работы.** Целью данной работы явилось изучение вовлеченности метилирования CpG-островков, перекрывающих промоторные участки генов микроРНК в патогенез НМРЛ и РТК и оценка диагностических качеств панелей маркеров на основе исследованных генов.

**Задачи исследования.**

1. Исследовать статус и частоту метилирования CpG-островков 14 генов микроРНК: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-107*, *mir-124a3*, *mir-125b1*, *mir-130b*, *mir-137*, *mir-129-2*, *mir-193a*, *mir-203*, *mir-212*, *mir-375* и *mir-1258* на представительной выборке клинических образцов первичных опухолей и гистологически нормальной ткани легкого пациентов с НМРЛ и ткани легкого доноров без онкопатологий.
2. Исследовать статус и частоту метилирования CpG-островков семи генов микроРНК *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2*, *mir-193a*, *mir-203* и *mir-212* на представительной выборке клинических образцов опухолей и гистологически нормальной ткани толстой кишки пациентов с РТК и ткани толстой кишки доноров без онкопатологий.
3. Исследовать корреляции между частотой метилирования изучаемых генов и клинико-патологическими свойствами первичных опухолей РТК и НМРЛ, а также их подтипов.
4. Разработать на основе полученных данных о частотах метилирования группы генов микроРНК панели молекулярных маркеров для ранней диагностики опухолей легкого и толстой кишки.

**Научная новизна.** В результате проведенного исследования опухолев-специфичное метилирование CpG-островков, перекрывающих регуляторные участки генов микроРНК, при НМРЛ впервые выявлено для генов: *mir-125b1*, *mir-129-2*, *mir-212*, *mir-375* и *mir-1258*. Кроме того, впервые исследовано метилирование гена *mir-137* на клиническом материале опухолей НМРЛ и определена частота метилирования CpG-островка этого гена в первичных опухолях легкого. Впервые показано отсутствие метилирования CpG-островков при НМРЛ генов *mir-130b* и *mir-107*. Выявлено специфичное метилирование CpG-островка гена *mir-1258* при НМРЛ, что представляет первое сообщение о вовлеченности метилирования гена *mir-1258* в процесс онкогенеза. Впервые показано специфичное метилирование гена *mir-9-3* на клиническом материале первичных опухолей РТК.

Впервые выявлена статистически значимая ассоциация частоты метилирования CpG-островка гена *mir-125b1* с со стадией НМРЛ ( $P=0,036$ ) и наличием метастазов в региональных лимфоузлах ( $P=0,0496$ ). Впервые выявлена статистически значимая ассоциация частоты метилирования CpG-островка гена *mir-137* со стадией НМРЛ ( $P=0,023$ ).

Составлены оригинальные системы маркеров метилирования, позволяющие с высокой чувствительностью и специфичностью различать опухолевую ткань НМРЛ и здоровую ткань легкого.

**Теоретическая и практическая значимость.** Идентифицированы новые гены микроРНК, подверженные аномальному метилированию при НМРЛ. Показана высокая частота метилирования CpG-островков группы генов микроРНК при злокачественных новообразованиях легкого и толстой кишки. Показана связь метилирования генов *mir-125b1* и *mir-137* с прогрессией НМРЛ.

Предложена система из 7 маркеров, которая позволяет с чувствительностью 81% и специфичностью 83% различить злокачественную опухоль НМРЛ от окружающей гистологически нормальной ткани легкого при обнаружении метилирования более чем в одном локусе из панели. Предложенная система маркеров позволяет различить злокачественную опухоль пациентов с НМРЛ от ткани легкого человека без онкопатологий с чувствительностью 81% и специфичностью 95% при обнаружении метилирования более чем в одном локусе из панели.

Предложена система из 4 маркеров, которая позволяет с чувствительностью 82% и специфичностью 93% различить злокачественную опухоль РТК от окружающей гистологически нормальной ткани толстой кишки при обнаружении метилирования более чем в двух локусах из панели. Предложенная система маркеров позволяет различить злокачественную опухоль пациентов с РТК от ткани толстой кишки человека без онкопатологий с чувствительностью 97% и специфичностью 78% при обнаружении метилирования более чем в одном локусе из панели.

**Апробация работы.** Диссертационная работа была представлена на заседании Секции молекулярной биологии Ученого Совета ФГУП «ГосНИИ генетика» 28 марта 2013 г. Материалы работы были представлены на 7-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения 2011» (Санкт-Петербург, апрель, 2011), научной конференции «Актуальные проблемы онкогенетики» (Москва, октябрь, 2011), XV Российском онкологическом конгрессе (Москва, ноябрь, 2011).

**Публикации.** По теме диссертационного исследования опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации, 4 материала конференций, зарегистрирована заявка на патент.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы), описания результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 326 источников. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 32 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

**Выборка образцов.** Парные образцы опухолевой и гистологически нормальной ткани получали в Отделе патологической анатомии опухолей человека НИИ Клинической Онкологии ГУ РОНЦ РАМН. Использовали ткани только тех больных, которые до операции не получали лучевую или химиотерапию. Выборка включала 87 случаев: 48 случаев немелкоклеточного рака легкого и 39 случаев рака толстой кишки. Все случаи НМРЛ и РТК классифицированы клинически по системе TNM и типированы гистологически в отделе патоморфологии опухолей НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ РАМН. 20 образцов ткани легкого и 14 образцов ткани толстой кишки от постмортальные лиц, без выявленных онкопатологий (по данным анамнеза), были получены в патологоанатомическом отделе НИИ Скорой Помощи им. Склифосовского. Далее постмортальные лица без онкопатологий в анамнезе будут обозначены как доноры.

**Выделение геномной ДНК.** Выделение геномной ДНК осуществляли по стандартному протоколу (*Sambrook et al., 1989*).

**Бисульфитная конверсия ДНК.** Бисульфитную конверсию геномной ДНК проводили по стандартному протоколу (*Datman et al., 2000*).

**Метил-специфичная полимеразная цепная реакция (МС-ПЦР).** МС-ПЦР проводили на бисульфит-конвертированной ДНК с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, либо в 10% полиакриламидном геле. Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на неконвертированной ДНК. Конвертированную ДНК клеточной линии L-68 ("СибЭнзим", Россия) использовали как контроль для неметилированных аллелей. В качестве позитивного контроля 100%-ого метилирования использовали конвертированную ДНК клеточной линии L-68, обработанную метилтрансферазой SssI ("СибЭнзим", Россия).

**Секвенирование продукта МС-ПЦР.** Продукт МС-ПЦР наносили на 1,5 % агарозный гель и очищали с использованием QIAquick Gel Extraction Kit ("Qiagen", Германия). Секвенирование проводили на секвенаторе SEQ 8000 ("Beckman-Coulter", США) в Центре коллективного пользования в "ГосНИИ генетика".

**Бисульфитное секвенирование.** Бисульфитную конверсию образцов ДНК осуществляли набором EZ DNA Methylation Kit ("Zymo research", США), амплифицировали, очищали с использованием Invisorb Spin DNA Extraction Kit ("Strattec molecular", США), клонировали с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit ("Thermo Scientific", США) и секвенировали клоны на приборе ABI 3730 ("Applied Biosystems", США).

**Статистическая обработка результатов.** Расчет значимости различий между выборками выполняли с помощью точного критерия Фишера с применением программы AtteStat. При проведении ROC-анализа применяли программы MedCalc v.11.5 и AtteStat.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании анализа биоинформационных баз данных и данных литературы были отобраны и экспериментально исследованы 14 генов микроРНК: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-107*, *mir-124a-3*, *mir-125b1*, *mir-130b*, *mir-137*, *mir-129-2*, *mir-193a*, *mir-203*, *mir-212*, *mir-375* и *mir-1258*. Экспериментальная часть включает исследование выборки парных образцов опухолей и гистологически нормальной ткани от пациентов с немелкоклеточным раком легкого и раком толстой кишки, а также образцов ткани тех же органов от доноров без онкопатологии в анамнезе. В качестве основного метода исследования использован метод метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР). Корректность результатов, полученных методом МС-ПЦР, проверена и подтверждена с применением метода бисульфитного секвенирования на примере генов *mir-34b/c* и *mir-124a-3* в отдельных образцах НМРЛ. Анализ метилирования гена *mir-34b/c* выполнен прямым секвенированием продукта МС-ПЦР, а гена *mir-124a-3* с помощью секвенирования предварительно полученных клонов бисульфит-конвертированной ДНК.

### 2.1 Профиль метилирования генов микроРНК при НМРЛ

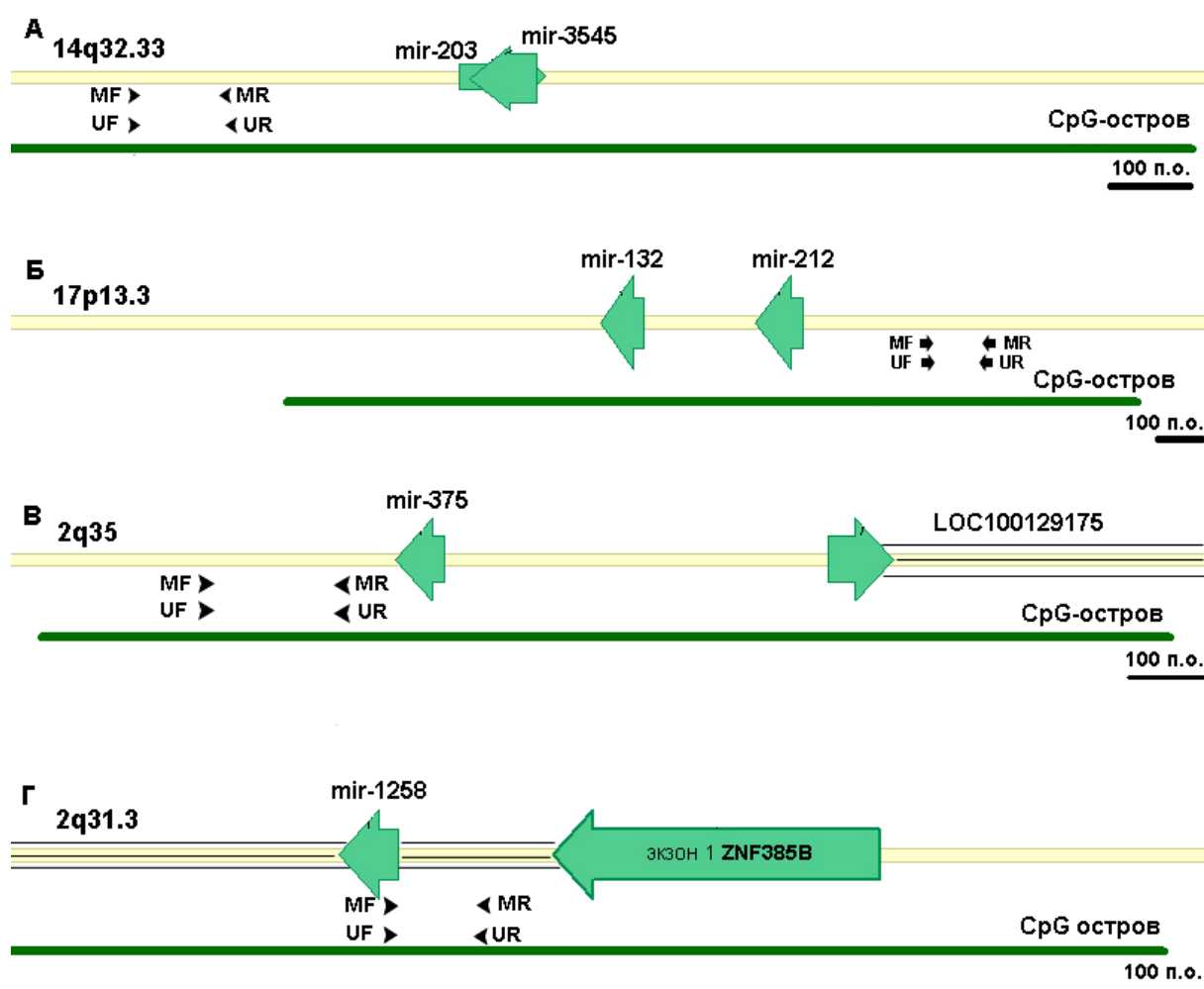
Первичный скрининг перечисленных 14 генов микроРНК при НМРЛ был проведен на образцах опухолей и гистологически нормальной ткани легкого 11 пациентов и ткани легкого 14 доноров без онкопатологии в анамнезе. По результатам первичного скрининга дальнейшее исследование генов *mir-107* и *mir-130b* признано неперспективным, т.к. для этих генов показано практически полное отсутствие метилирования.

Анализ метилирования 12 генов микроРНК при НМРЛ выполнен на выборках, включающих от 39 до 46 парных образцов опухолей и гистологически нормальной ткани пациентов с НМРЛ и 20 образцов ткани легкого от доноров без онкопатологии.

При проведении МС-ПЦР, специфичной к неметилированному аллелю, продукт амплификации выявлен во всех анализированных образцах ДНК опухолей. Образование такого продукта при анализе ДНК первичных опухолей связывают, главным образом, с их загрязнением прилежащей гистологически нормальной тканью и наличием в опухолевом очаге клеток иммунной системы и ассоциированных фибробластов. Таким образом, наличие метилирования определяли по результатам МС-ПЦР с праймерами, специфичными к метилированным аллелям. Корректность результатов, полученных методом МС-ПЦР, проверена и подтверждена с применением секвенирования продукта МС-ПЦР локуса *mir-34b/c*. Карты CpG-островков, перекрывающих регуляторные районы генов микроРНК и положение соответствующих сайтов связывания праймеров показаны на примере четырех генов (*mir-203*, *mir-212*, *mir-375* и *mir-1258*) на рис. 1.

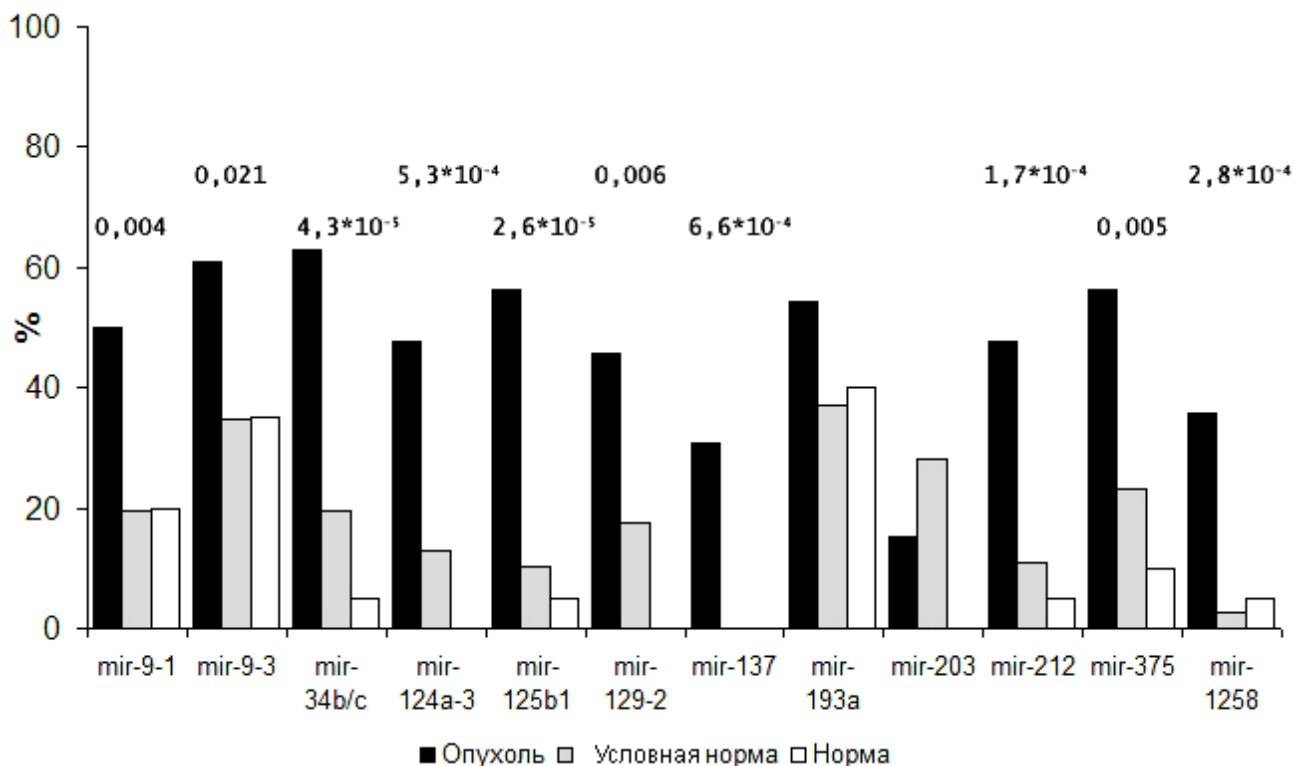
На основании результатов анализа метилирования методом МС-ПЦР рассчитаны частоты метилирования 12 генов микроРНК при НМРЛ (39-46 случаев), в т.ч. ПРЛ (32 случая) и АД (16 случаев); результаты анализа показаны графически на рис. 2, 3 и 4, отражая профили метилирования 12 генов микроРНК при НМРЛ, ПРЛ и АД.

Как следует из полученных данных частоты метилирования CpG-островков 9-ти генов микроРНК (*mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-124a3*, *mir-125b1*, *mir-129-2*, *mir-193a*, *mir-212*, *mir-375*) в опухолях при НМРЛ достигают 46-63%. Статистически значимые различия ( $p \leq 0.05$  по Фишеру) между частотами метилирования в образцах опухолей и гистологически нормальной ткани пациентов с НМРЛ установлены для 10-ти генов: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-124a-3*, *mir-125b1*, *mir-137*, *mir-129-2*, *mir-212*, *mir-375* и *mir-1258*.

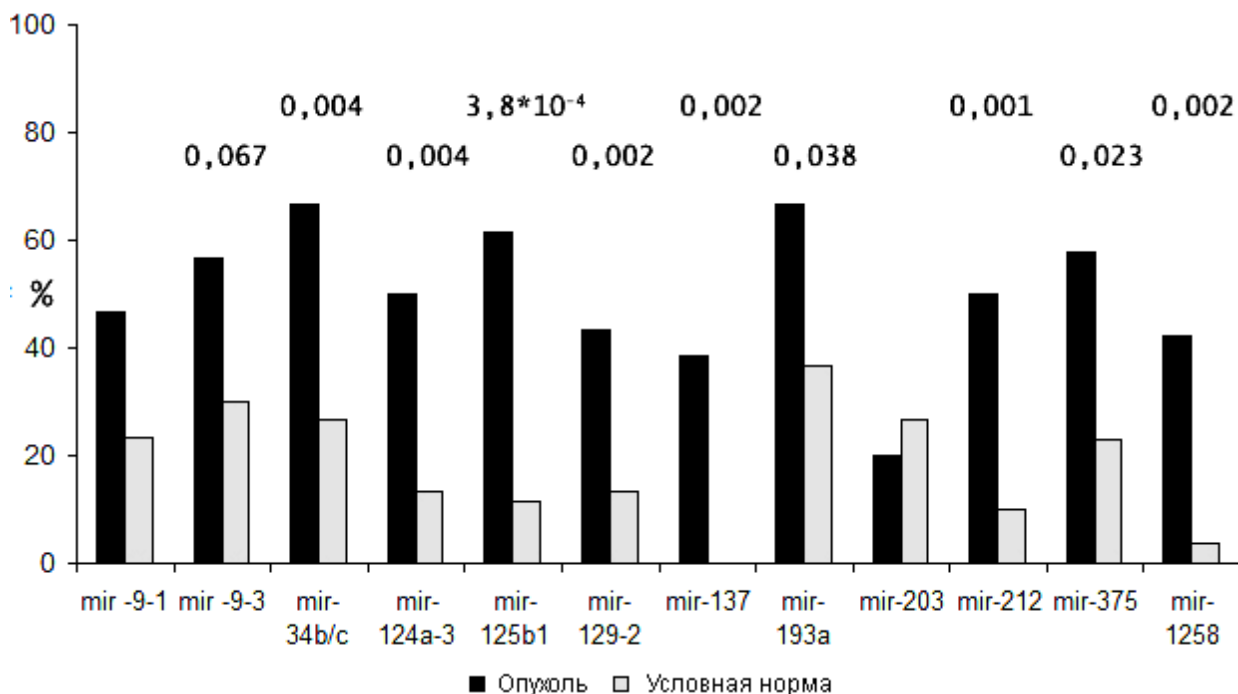


**Рисунок 1.** Локализация CpG-островков в промоторных регионах и дизайн праймеров для четырех генов микроРНК (*mir-203*, *mir-212*, *mir-375* и *mir-1258*). Праймеры подобраны с помощью программ Primer Select (“DNASTar”, США) и MethPrimer Express (“Invitrogen”, США). Участок связывания включал от 4 до 7 CpG на пару праймеров и от 4 до 10 цитозиновых остатков, окружающих CpG-динуклеотиды. **MF/MR** - прямой и обратный праймеры к метилированному аллелю; **UF/UR** – прямой и обратный праймеры к неметилированному аллелю; **100 п.о.** – масштаб.

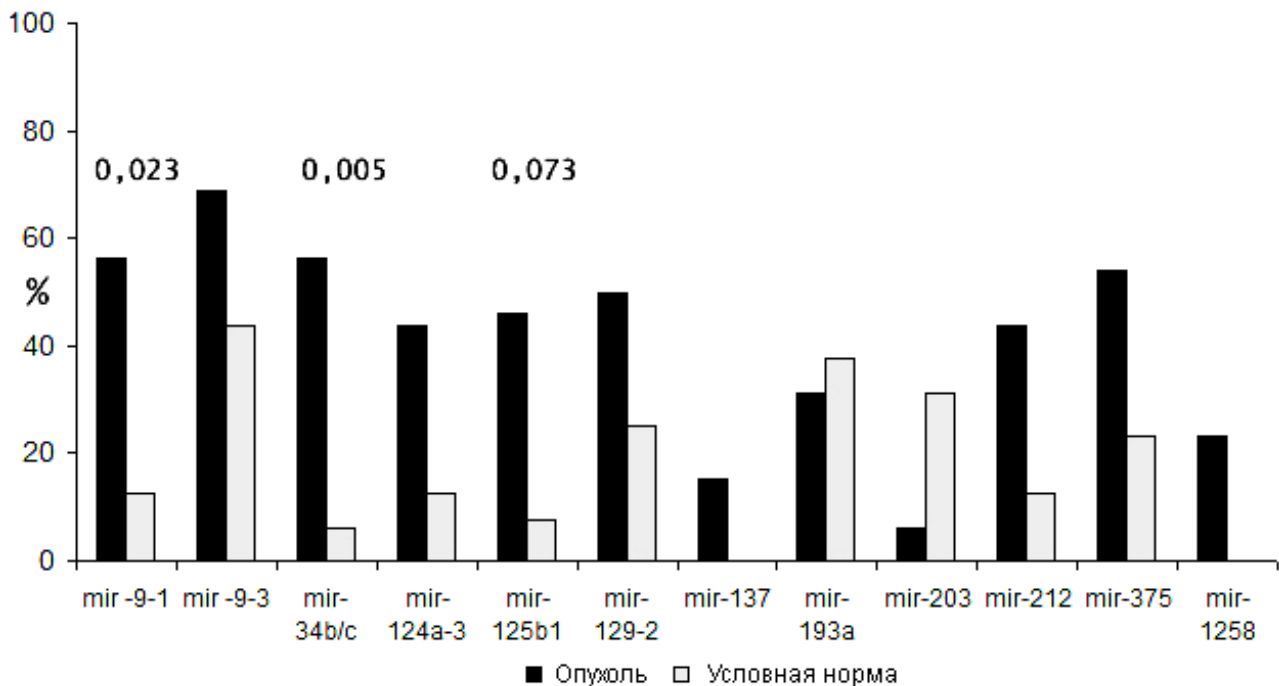




**Рисунок 2.** Профиль метилирования 12 генов микроРНК в образцах опухолевой и гистологически нормальной ткани (условная норма) тех же пациентов с НМРЛ, а также нормальной ткани легкого от доноров без онкопатологий в анамнезе (норма). Показаны статистически значимые вероятности, рассчитанные с помощью точного теста Фишера.



**Рисунок 3.** Профили метилирования 12 генов микроРНК в образцах опухолевой и гистологически нормальной ткани тех же пациентов с ПРЛ. Статистическую значимость рассчитывали при помощи точного теста Фишера. Даны показатели достоверных ( $p \leq 0.05$ ) различий и показатели маргинальной значимости ( $0.05 < p \leq 0.1$ ) (когда обнаруженное различие достоверно на 94% в отличие от стандартного доверительного интервала 95% при  $p=0.05$ ).



**Рисунок 4.** Профили метилирования 12 генов микроРНК в образцах опухолевой и гистологически нормальной ткани (условная норма) тех же пациентов с АД. Статистическую значимость рассчитывали при помощи точного теста Фишера. Даны показатели достоверных ( $p \leq 0.05$ ) различий и показатели маргинальной значимости ( $0.05 < p \leq 0.1$ ) (когда обнаруженное различие достоверно на 94% в отличие от стандартного доверительного интервала 95% при  $p = 0.05$ ).

Следует отметить, что у семи генов микроРНК (*mir-34b/c*, *mir-124a3*, *mir-125b1*, *mir-137*, *mir-129-2*, *mir-212*, *mir-1258*) из 12 изученных частоты метилирования в образцах тканей легкого от 20 доноров без онкопатологии варьировали 0-5%, и составили 10% у *mir-375*. Интересно, что частота метилирования этих восьми генов была в 2-3 раза выше в гистологически нормальной ткани легкого пациентов с НМРЛ. Повышение частоты метилирования гена в условной норме по сравнению с нормой по донорам может означать, что события, выявленные нами на молекулярном уровне, опережают изменения на морфологическом уровне, и может указывать на вовлеченность в онкогенез ткани, близлежащей к опухоли. Можно предполагать также, что метилирование этих генов относится к ранним событиям в патогенезе легкого.

Напротив, для генов *mir-9-1*, *mir-9-3* и *mir-193a* отмечены высокие частоты метилирования и в образцах гистологически нормальной ткани легкого пациентов с НМРЛ, и в образцах тканей легкого от 20 доноров без онкопатологии, составившие 20, 35 и 37-40%, соответственно. Для генов *mir-9-1*, *mir-9-3* и *mir-193a*, по данным литературы, выявлены черты онкосупрессоров и показана роль метилирования в эпигенетической инактивации при раке легкого (*Lujambio et al., 2008; Tan et al., 2010; Kitano et al., 2011; Heller et al., 2012*). С учетом таких данных, можно предположить специфическое метилирование этих онкосупрессорных генов в тканях легкого

здоровых людей региона России, возможно обусловленное экологическими особенностями нашего региона.

Статус метилирования промоторного участка *mir-34b/c* при НМРЛ по данным литературы изучен подробно, однако окончательной ясности в этом вопросе нет. Так, частота выявления метилирования локуса *mir-34b/c* различается в опубликованных работах от 41% до 26% (*Watanabe et al., 2011; Tanaka et al., 2012*). Причем при анализе клеточных линий и первичных опухолей рака легкого оказалось, что метилирование локуса *mir-34b/c* встречается существенно чаще при МРЛ, чем при НМРЛ ( $p < 0.001$ ) (*Tanaka et al., 2012*). Согласно нашим результатам частота метилирования CpG-островок промоторного района локуса *mir-34b/c* в первичных опухолях НМРЛ достигает 63%, в гистологически нормальных тканях легкого пациентов – 20% и в образцах тканей легкого доноров без онкопатологии – 5%. Данные литературы наряду с нашими результатами убедительно свидетельствуют в пользу онкосупрессорной функции гена *mir-34b/c*.

Ранее гиперметилирование локуса *mir-124a-3* в опухолях легкого было выявлено с частотой 48-50% (*Lujambio et al., 2007; Tan et al., 2010; Kitano et al., 2011*). Согласно нашим результатам частота метилирования промоторного района гена *mir-124a-3* в опухолях НМРЛ составляет 48%, в условной норме пациентов – 13% и в образцах ткани легкого от доноров метилирование не обнаружено. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы.

Метилирование CpG-островков девяти генов микроРНК (*mir-129-2, mir-203, mir-212, mir-107, mir-130b, mir-137, mir-125b1, mir-375, mir-1258*) исследовано в первичных опухолях НМРЛ впервые. Статистически значимые различия между частотой метилирования в опухолях и гистологически нормальной ткани легкого пациента выявлены для шести генов: *mir-129-2, mir-212, mir-137, mir-125b1, mir-375* и *mir-1258*. Ранее для каждого из этих генов имелись экспериментальные данные о вовлеченности в патогенез эпителиальных опухолей.

Так, при НМРЛ выявлено снижение экспрессии гена *mir-137* (*Dacic et al., 2010*) и на клеточных линиях с помощью деметилирующего агента показана роль метилирования в подавлении активности этого гена (*Zhu et al., 2013*). Нами впервые определена частота метилирования CpG-островка *mir-137* в первичных опухолях легкого, составившая 31%.

Данные литературы о роли *mir-375* в патогенезе легкого неоднозначны. Так, показано повышение экспрессии *mir-375* при МРЛ (*Zhao et al., 2012*), нейроэндокринном раке легкого (*Nishikawa et al., 2011*) и аденокарциноме (*Yu et al., 2010*). При НМРЛ, напротив, показано снижение экспрессии *mir-375* (*Friboulet et al., 2011; Li et al., 2012*). Выявленное нами впервые гиперметилирование *mir-375* в первичных опухолях НМРЛ с частотой до 56% может быть механизмом подавления активности этого гена в опухолях легкого, что позволяет предположить опухоль-супрессорную функцию *mir-375* при НМРЛ.

Нами впервые обнаружено метилирование CpG-островка гена *mir-1258* при НМРЛ с частотой 36%. Ранее установлено 3-х кратное снижение уровня экспрессии *mir-1258* при НМРЛ (Liu et al., 2012). Наши данные о гиперметилировании *mir-1258* показывают, что механизм подавления *mir-1258* при НМРЛ может быть связан с метилированием этого гена. Ранее было также показано, что ген *mir-1258* при НМРЛ и РМЖ выполняет функцию негативного регулятора экспрессии гена гепараназы (*HPSE*), участвующей в регуляции ростовых и ангиогенных процессов (Zhang et al., 2011; Liu et al., 2012). *HPSE* характеризуется повышенной экспрессией в опухолях разных локализаций, которая увеличивается с метастазированием. Сопоставление наших и литературных данных позволяет предположить, что гиперметилирование *mir-1258* может быть опосредованно вовлечено в активацию гена *HPSE* при НМРЛ.

Данные литературы о роли *mir-212* в патогенезе НМРЛ неоднозначны. Рядом исследований показана повышенная экспрессия *mir-212* в опухолях легкого с различной гистологией (Yanaihara et al., 2006; Rabinowits et al., 2009). С другой стороны, *in vivo* и *in vitro* показано, что ген *mir-212* снижает свою экспрессию в клеточных линиях и первичных опухолях НМРЛ (Incoronato et al., 2010). Причем, восстановление экспрессии *mir-212* в клеточных линиях НМРЛ активирует пролиферацию, процессы миграции и инвазии (Li et al., 2012). Сделано предположение, что модификации гистонов (H3K27me3, H3K9me2 и H3K9Ac) ответственны за подавление экспрессии *mir-212* при НМРЛ (Incoronato et al., 2011).

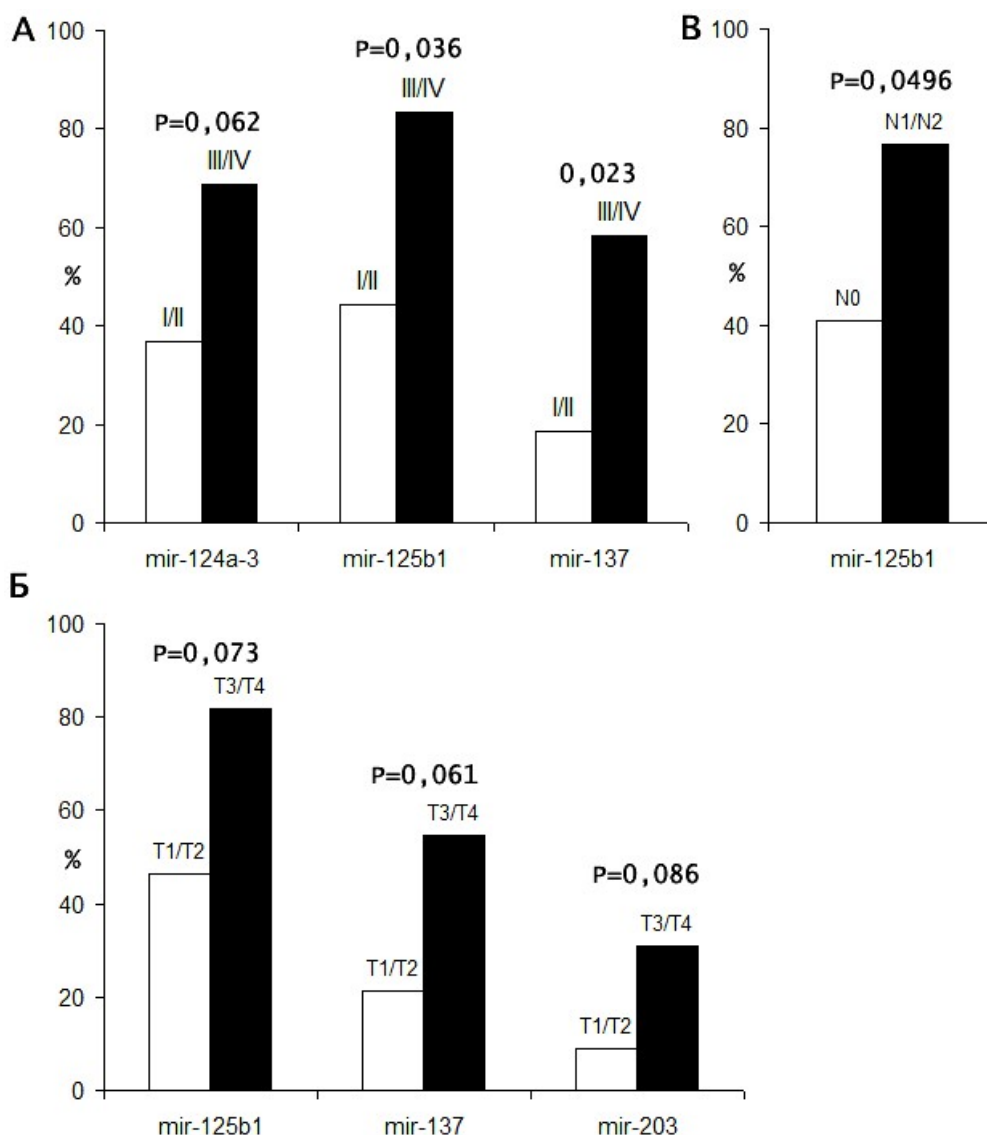
Нами впервые изучено метилирование гена *mir-212* в первичных опухолях НМРЛ. Согласно нашим результатам, CpG-островок гена *mir-212* метилирован в опухолях при НМРЛ с частотой 48%, в условно нормальной ткани легкого пациентов с частотой 11% и в ткани легкого у доноров без онкопатологии с частотой 5%. Эти данные могут означать вовлеченность метилирования *mir-212* в патогенез НМРЛ и, возможно, в эпигенетическую инактивацию этого гена.

### Связь с прогрессией заболевания НМРЛ

Проведен анализ возможных корреляций частот метилирования 12 генов микроРНК с показателями прогрессии НМРЛ, и отдельно ПРЛ и АД. На основании полученных результатов были рассчитаны возможные корреляции частот метилирования генов микроРНК с клинической стадией (III/IV vs. I/II), со степенью анаплазии (ld vs. md/hd), с размером опухоли (T3/T4 vs. T1/T2) и с появлением метастазов в регионарных узлах (N1/N2 vs. N0). Выявленные корреляции представлены на рис. 5 и 6.

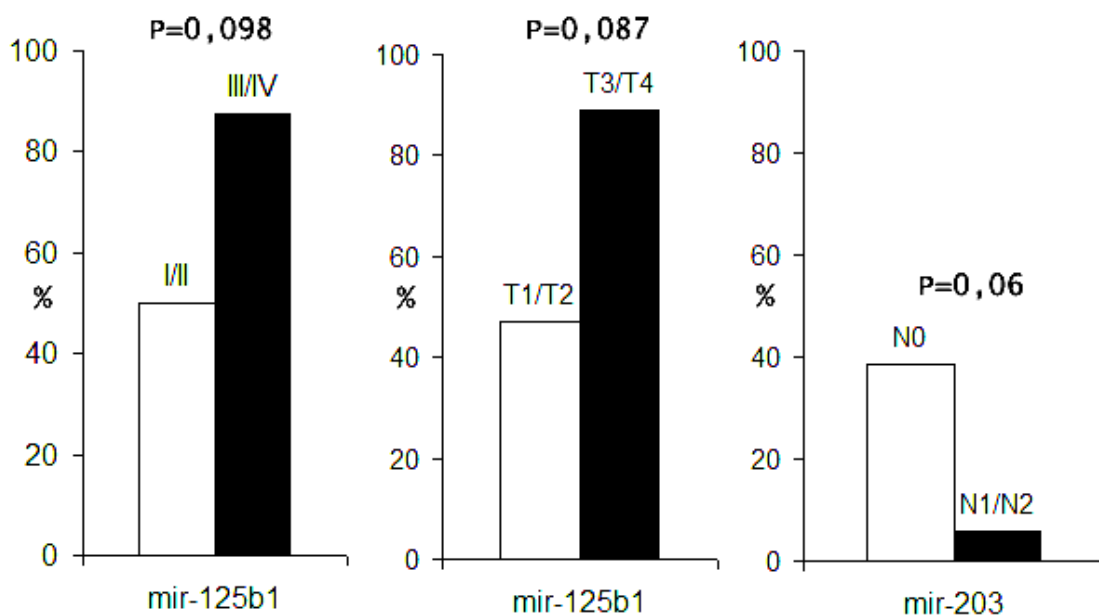
Так, установлены значимые корреляции частоты метилирования генов *mir-125b1* и *mir-137* со стадией НМРЛ и *mir-125b1* – с метастазированием при НМРЛ, а также маргинально значимые корреляции частоты метилирования генов *mir-124a-3* со стадией НМРЛ и *mir-125b1*, *mir-137* и *mir-203* с увеличением размера опухоли. При ПРЛ выявлены только маргинально значимые корреляции для гена *mir-125b1* с клинической стадией и размером

опухоли и для гена *mir-203* с метастазированием. Причем, показана тенденция связи активного метастазирования с деметилированием гена *mir-203*.



**Рисунок 5.** Корреляция частоты метилирования генов микроРНК с прогрессией НМРЛ. Анализ выполнен с учетом клиничко-гистологических данных пациентов: **А**, клинической стадии (I+II/III+IV); **Б**, размера опухоли (T1/T2/T3+T4); **В**, отсутствия (N0) или наличия (N1/2) метастазов в лимфоузлах. Статистическую значимость рассчитывали при помощи точного теста Фишера.

Согласно данным литературы, для гена *mir-125b1* показана связь экспрессии с клиничко-патологическими свойствами опухолей. Так, показано, что к генам-мишеням *mir-125b1* относится ген *ETS1*, для которого установлена повышенная экспрессия при метастазирующем РМЖ и корреляция с плохим прогнозом (*Soto-Reyes et al., 2012*). Ранее также показано, что эпигенетическая инактивация *mir-125b1* вносит вклад в формирование инвазивного фенотипа при гепатоцеллюлярной карциноме. В частности, *mir-125b1* подавляла экспрессию *MMP-2* и *MMP-9* – генов, участвующих в деградации межклеточного матрикса (*Alpini et al., 2011*).



**Рисунок 6.** Корреляция частоты метилирования генов микроРНК с прогрессией ПРЛ. Анализ выполнен с учетом клиничко-гистологических данных пациентов: клинической стадии (I+II/III+IV); размера опухоли (T1/T2/T3+T4); отсутствия (N0) или наличия (N1/2) метастазов в лимфоузлах. Статистическую значимость рассчитывали при помощи точного теста Фишера.

Нами впервые показана статистически значимая ( $p \leq 0.05$ ) корреляция частоты метилирования гена *mir-125b1* с клинической стадией НМРЛ (44% при I+II *против* 83% при III+IV) и наличием метастазов в региональных лимфоузлах (41% при N<sub>0</sub> *против* 76% при N<sub>1</sub>+N<sub>2</sub>). Кроме того, нами показана маргинально значимая корреляция частоты метилирования *mir-125b1* с размером опухоли (46% при T<sub>1</sub>+T<sub>2</sub> *против* 82% при T<sub>3</sub>+T<sub>4</sub>) (рис. 5).

Метилирование промотора гена *mir-137* ассоциировано с худшим прогнозом заболевания при опухолях головы и шеи (Wang *et al.*, 2011).

Нами впервые показано, что метилирование CpG-островка гена *mir-137* связано с прогрессией НМРЛ. Так, частота метилирования гена *mir-137* статистически значимо ( $P \leq 0.05$ ) ассоциирована со стадией НМРЛ (19% при I+II *против* 58% при III+IV) и маргинально значимо – с размером опухоли (21% при T<sub>1</sub>+T<sub>2</sub> *против* 55% при T<sub>3</sub>+T<sub>4</sub>) (рис. 5).

В нашей работе показаны маргинально значимая корреляция повышения частоты метилирования *mir-203* с размером опухоли при НМРЛ ( $P=0,086$ ), но понижения частоты метилирования *mir-203* с метастазированием при ПРЛ ( $P=0,06$ ) (рис. 5 и 6). Данные литературы по свойствам и функции гена *mir-203* также весьма противоречивы. Например, для РТК показана ассоциация гиперэкспрессии гена *mir-203* с агрессивным характером опухолей (Yantiss *et al.*, 2009), однако в другой работе показано, что гиперэкспрессия *mir-203* может подавлять пролиферацию и активировать апоптоз (Li *et al.*, 2011).



Результаты бисульфитного секвенирования согласуются с данными, полученными с применением метода МС-ПЦР. Бисульфитным секвенированием метилирование в образце опухоли 831-Т обнаружено с частотой 40%, а в образце гистологически нормальной ткани легкого 831-Н с частотой 3%. При этом методом МС-ПЦР в образце опухоли 831-Т метилирование обнаружено, а в образце 831-Н не обнаружено. В образце опухоли 709-Т метилирование обнаружено с частотой 6,6%, а в образце 709-Н с частотой 3,2%, что соответствовало отсутствию метилирования в этих образцах при использовании метода МС-ПЦР.

## 2.2 Профиль метилирования генов микроРНК при РТК

Были исследованы CpG-островки семи генов микроРНК (*mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2*, *mir-193a*, *mir-203* и *mir-212*) в парных образцах опухолевой и морфологически не измененной ткани толстой кишки пациентов с РТК, а также в образцах ткани толстой кишки доноров без онкопатологии в анамнезе. Суммарная выборка составила 39 случаев РТК (а именно, аденокарциномы толстой кишки) и 14 доноров без онкопатологии. В исследованной выборке РТК представлены опухоли, локализованные во всех отделах толстой кишки – ободочной, сигмовидной и прямой кишке.

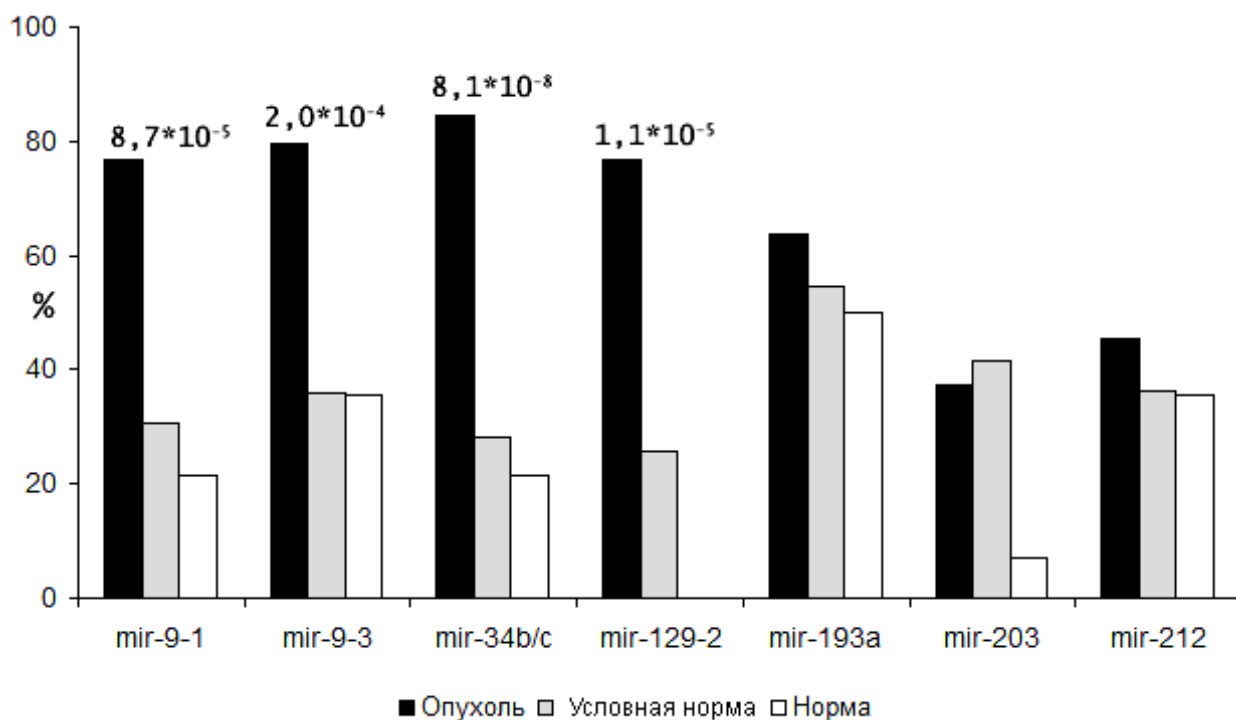
Метилирование CpG-островков четырех генов микроРНК (*mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2*) исследовано на полной выборке из 39 случаев РТК, а трех генов микроРНК (*mir-193a*, *mir-203*, *mir-212*) на выборке из 11-24 случаев РТК. Метилирование четырех генов (*mir-9-3*, *mir-193a*, *mir-203* и *mir-212*) исследовано в первичных опухолях РТК впервые.

На основании полученных данных рассчитаны частоты метилирования семи генов микроРНК при РТК; результаты анализа представлены графически на рис. 8, который отражает профиль метилирования этих генов микроРНК при РТК. Частоты метилирования семи генов микроРНК (*mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2*, *mir-193a*, *mir-212*, *mir-203*) в опухолях при РТК варьируют от 38% до 85%. Статистически значимые различия ( $p \leq 0.05$  по Фишеру) между частотами метилирования в образцах опухолей и гистологически нормальной ткани пациентов установлены для 4-х генов: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2* (рис. 8).

Частоты метилирования генов *mir-9-1*, *mir-9-3* и *mir-34b/c* в образцах ткани толстой кишки доноров без онкопатологии варьировали от 21% до 36 %, а в условной норме от 28% до 36%. Высокая частота обнаружения метилирования данных генов микроРНК в образцах ткани толстой кишки и в условной норме, и у доноров без онкопатологии, возможно, является свойством данного вида ткани, связанным с выполняемой функцией.

Частота метилирования гена *mir-129-2* повышается от 0% в ткани толстой кишки доноров без онкопатологии до 26 % в гистологически нормальной ткани пациентов с РТК. Данное изменение носит выраженный опухоль специфичный характер.





**Рисунок 8.** Профиль метилирования 7 генов микроРНК на выборке опухолевой и гистологически нормальной ткани (условная норма) пациентов с РТК и нормальной ткани толстой кишки от доноров без онкопатологии в анамнезе (норма). Показаны статистически значимые вероятности, рассчитанные с помощью точного теста Фишера.

Сравнение профилей метилирования генов микроРНК при НМРЛ и РТК показывает, что для РТК в целом характерна более высокая частота обнаружения метилирования CpG-островков генов микроРНК, чем для НМРЛ. Метилирование гена *mir-212* наблюдается в 50% случаев НМРЛ и только в 40% случаев РТК и, по-видимому, более специфично для НМРЛ.

По данным литературы поведение генов *mir-9-1* и *mir-9-3* при РТК отличается двойственностью. Повышенной экспрессией генов семейства *mir-9* характеризуются опухоли РТК с отдаленными метастазами (*Zhu et al., 2012*). В других работах показано, что *mir-9-1* и *mir-9-3* метилированы в клеточных линиях РТК, ген *mir-9-1* метилирован в первичных опухолях РТК с частотой 56% и метилирование *mir-9-1* ассоциировано с присутствием метастазов в лимфоузлах (*Bandres et al., 2009; Vinci et al., 2013*). Полученные в данной работе результаты о высокой частоте метилирования генов *mir-9-1* и *mir-9-3* при РТК (рис. 8) и данные литературы позволяют предполагать роль онкосупрессоров для этих генов на стадиях онкогенеза до метастазирования. Можно отметить, что в нашей работе впервые исследовано метилирование *mir-9-3* на клиническом материале РТК и определена частота метилирования этого гена в первичных опухолях, достигающая почти 80% (рис. 8).

Метилирование промоторной области гена *mir-34b/c*, по данным литературы, ассоциировано со снижением содержания этих микроРНК *mir-34b* и *mir-34c* в клеточных линиях и образцах первичных опухолей РТК, причем

частота метилирования достигала 90% (*Toyota et al., 2008*). Результаты, полученные в нашей работе, согласуются с данными литературы и показывают важную роль метилирования гена *mir-34b/c* в патогенезе РТК.

По данным литературы метилирование гена *mir-129-2* обнаружено в клеточных линиях и первичных опухолях толстой кишки с частотой 91% (*Bandres et al., 2009*). Наши результаты согласуются с данными литературы. Нами показано, что *mir-129-2* метилирован в первичных опухолях РТК с частотой до 77%, в условной норме пациентов с частотой 26% и в ткани толстой кишки доноров без онкопатологии метилирование *mir-129-2* не обнаружено.

### **2.3 Диагностическое применение систем маркеров, основанных на анализе метилирования генов микроРНК, при НМРЛ и РТК**

В качестве молекулярных маркеров широко используются тесты по изменению экспрессии наборов генов микроРНК в тканях опухолей, крови, плазме и других биологических жидкостях пациента. Панели маркеров на основе экспрессии генов микроРНК позволяют различать типы опухолей легкого (МРЛ и НМРЛ) и подтипы НМРЛ – АД и ПРЛ (*Wu et al., 2011*), выявлять заболевание на ранней стадии по анализу плазмы крови (*Ren Y., 2011*), а также выделять группы пациентов с плохим прогнозом выживаемости (*Jassem and Skrzypski, 2012*). Возможности использования метилирования CpG-островков генов микроРНК для диагностики и прогностических целей при НМРЛ и РТК изучены слабее. Имеется единственный патент для диагностики опухолей разных локализаций, основанный на определении экспрессии и/или статуса метилирования генов *mir-148*, *mir-34b/c* и генов семейства *mir-9* (*Lujambio and Esteller, 2010*). Хотя применение этих методов при анализе опухолевой ткани и/или биологических жидкостей пациента позволяет различать опухоли с метастатическим потенциалом и при наличии метастазов.

#### *Системы маркеров для диагностики НМРЛ*

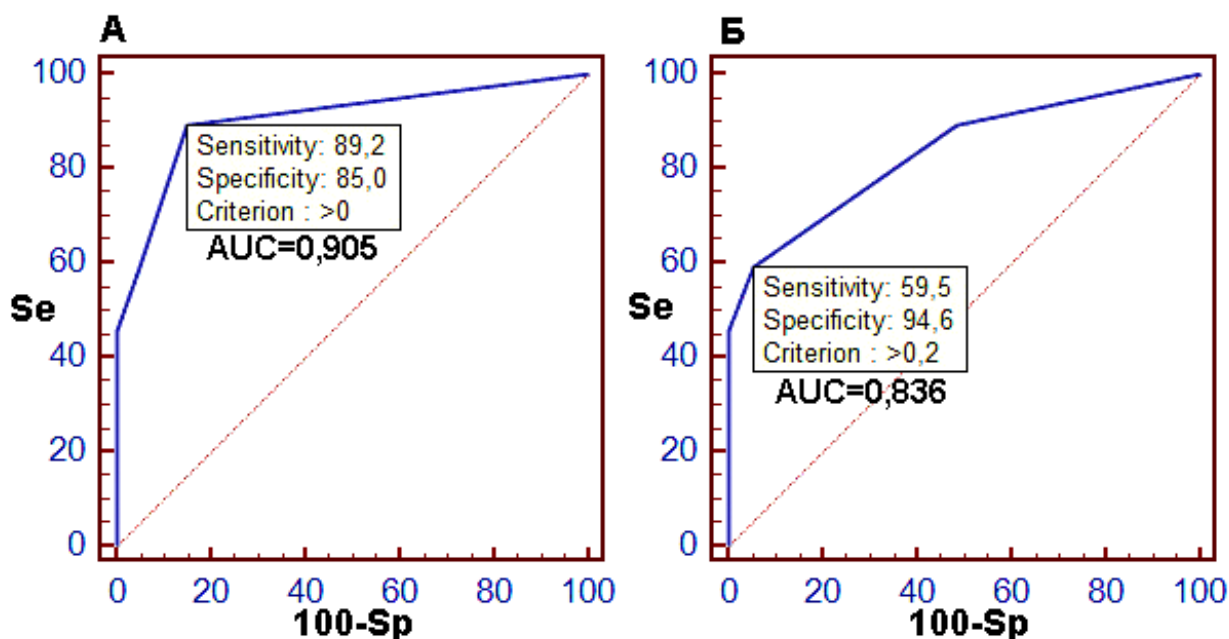
На основе полученных результатов по изменению метилирования группы генов микроРНК нами проведена оценка диагностических качеств панелей маркеров. Были оценены системы маркеров по способности различать опухолевую и нормальную ткань. Методом сравнения диагностических качеств панелей генов микроРНК был выбран метод ROC-анализа. В качестве группы «случай» использованы данные полной выборки образцов НМРЛ (48 случаев) без разбиения на подтипы; в качестве группы «контроль» использованы выборка гистологически нормальной ткани легкого (условная норма) от тех же пациентов (48 случаев) и выборка ткани легкого от 20 доноров без онкопатологии в анамнезе.

При использовании в качестве маркера какой-либо одной из исследованных микроРНК, не достигается требуемых практикой значений чувствительности и специфичности. Для подбора системы маркеров был

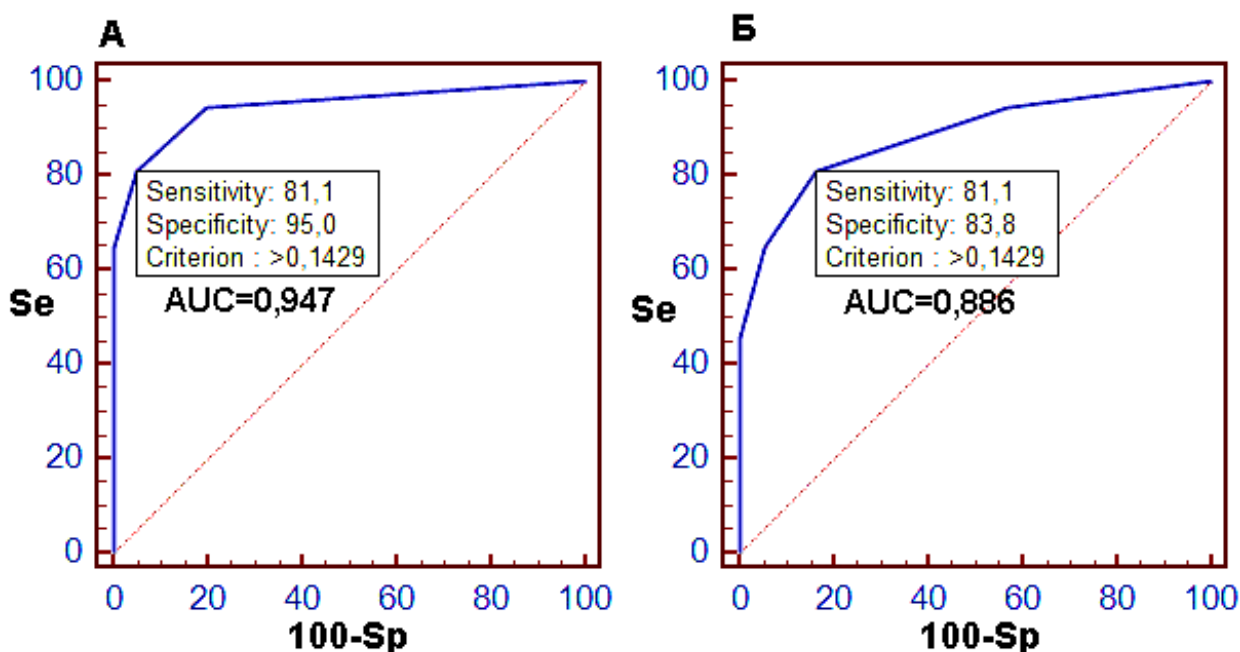
проведен анализ сочетаний генов микроРНК для достижения наилучшего соотношения чувствительности, специфичности и AUC. Панели генов микроРНК оценивали по параметру индекса метилирования с определением оптимального отсекающего значения для максимизации чувствительности и специфичности. Под индексом метилирования понимается отношение числа метилированных локусов к общему числу локусов модели.

По результатам предварительного анализа сочетаний двух, трех и более маркеров были отобраны гены, которые вносят наибольший вклад в повышение диагностических характеристик системы маркеров: *mir-125b1*, *mir-375*, *mir-129-2*, *mir-34b/c*, *mir-124a-3*, *mir-137* и *mir-1258*. Расчеты проведены для панели, составленной из пяти генов микроРНК, выявленных впервые в данной работе (*mir-125b1*, *mir-375*, *mir-129-2*, *mir-137* и *mir-1258*, рис. 9), и для панели семи наиболее представительных маркеров, включающих также гены *mir-34b/c*, *mir-124a-3*, описанные в литературе ранее (рис. 10).

Более показательным можно считать сравнение данных для опухоли с данными для нормы (доноры без онкопатологии), чем с условной нормой пациентов. На рис. 9 и 10 показано построение ROC-кривых для двух вариантов (контроль – условная норма, либо норма по донорам без онкопатологии).



**Рисунок 9.** ROC-анализ по параметру индекс метилирования для системы из пяти маркеров: *mir-125b1*, *mir-129-2*, *mir-137*, *mir-375*, *mir-1258*. **А** – результаты, полученные при сравнении образцов опухолей и нормы (доноры без онкопатологии в анамнезе); **Б** – результаты, полученные при сравнении образцов опухолей и условной нормы. **Se** - чувствительность; **100-Sp** – доля ложноположительных результатов. **AUC** – показатель интегральной оценки качества и предсказательной способности модели; **критерий** – критерий отсечения ROC-кривой.



**Рисунок 10.** ROC-анализ по параметру индекс метилирования для системы из семи маркеров: *mir-125b1*, *mir-375*, *mir-129-2*, *mir-34b/c*, *mir-124a3*, *mir-137*, *mir-1258*. А – результаты, полученные при сравнении образцов опухолей и нормы (доноры без онкопатологии в анамнезе); Б – результаты, полученные при сравнении образцов опухолей и условной нормы. **Se** - чувствительность; **100-Sp** – доля ложноположительных результатов; **AUC** – показатель интегральной оценки качества и предсказательной способности модели; **критерий** – критерий отсечения ROC-кривой.

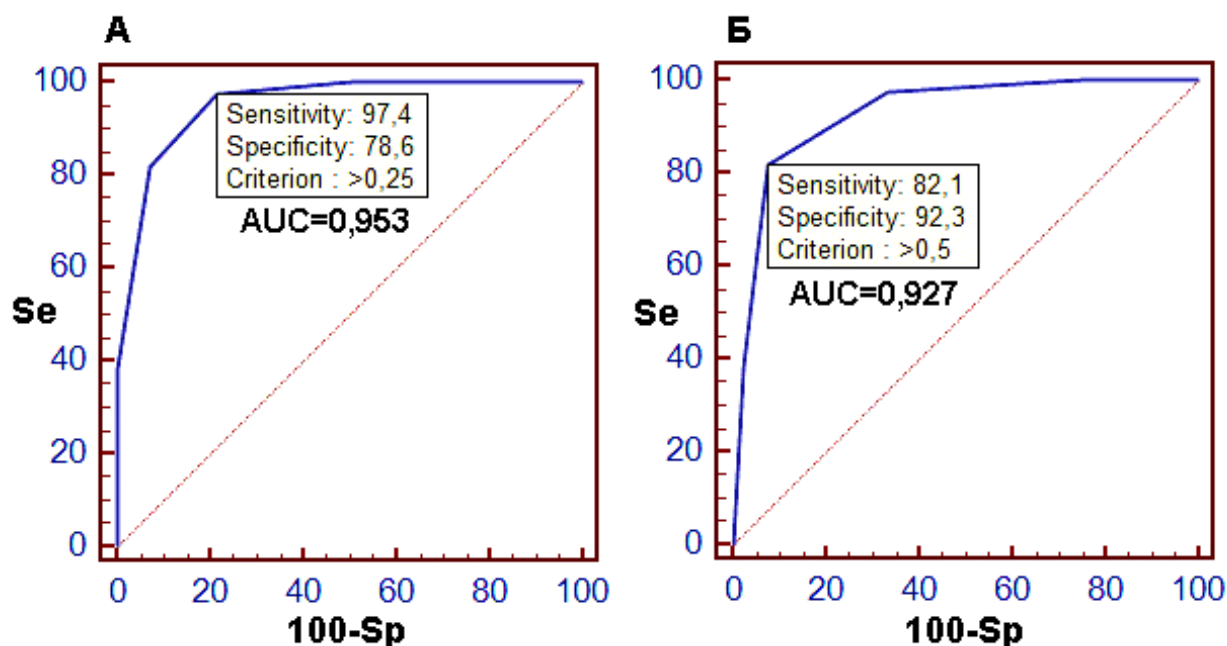
Как следует из рис. 9 и 10, каждая из рассмотренных систем (из 5 и 7 маркеров) имеет преимущества по какому-либо параметру (специфичности и чувствительности) и может найти применение в тестировании конкретного пациента. Качество модели (интегральный параметр) у обеих систем (если сравнение проводить с нормой по донорам) можно считать отличным – AUC варьирует между 0,9 и 1. В случае применения выборки норм от доноров без онкопатологии в анамнезе в качестве группы «контроль» значение критерия отсечения (порог отсечения) для панели из 5 генов равен «0», что означает возможность диагностики уже по одному идентифицированному локусу из панели. В случае выборки условных норм от тех же пациентов для постановки диагноза необходимо обнаружить метилирование минимум 2-х локусов из панели. В случае панели из 7 генов критерий отсечения равен одному локусу и, следовательно, для постановки диагноза необходимо обнаружить метилирование минимум 2-х локусов из панели.

#### *Системы маркеров для диагностики РТК*

Аналогичным образом, метод ROC-анализа применили для формирования и оценки системы маркеров для диагностики РТК. В качестве группы «случай» использованы данные полной выборки образцов опухолей РТК (39 случаев); в качестве группы «контроль» использованы выборка

условных норм от пациентов (39 случаев) и выборка ткани толстой кишки от 14 доноров без онкопатологии в анамнезе. Для анализа взяты только те гены микроРНК, которые показали опухоль специфичное гиперметиличирование: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2*. Далее проведен анализ сочетаний генов микроРНК для достижения наилучшего соотношения чувствительности, специфичности и AUC. Панели групп генов микроРНК оценивали по параметру индекса метилирования с определением оптимального отсекающего значения для максимизации чувствительности и специфичности. Расчеты проведены для панели из 4-х генов и представлены на рис. 11.

Критерий отсекающего для норм доноров составил 1 locus, для условных норм составил 2 locus. Качество модели можно считать отличным – AUC составляет 0,95 и 0,93. Если сравнивать с нормой (доноры без онкопатологии), чувствительность системы составляет 97%, а специфичность – 79%. При сравнении с условной нормой чувствительность системы ниже и равна 82%, а специфичность оказалась выше – до 92%. Но повышение этой величины при сравнении с условной нормой скорее связано с особенностями выборок, тем более что их численность составила 39 случаев РТК и только 14 норм доноров без онкопатологии. Тем не менее, диагностическое значение этой системы для раннего выявления опухолей толстой кишки очевидно.



**Рисунок 11.** ROC-анализ по параметру индекс метилирования для системы из четырех маркеров: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-129-2*. **А** – результаты, полученные при сравнении образцов опухолей и норм (доноры без онкопатологии в анамнезе); **Б** – результаты, полученные при сравнении образцов опухолей и условной нормы. **Se** - чувствительность; **100-Sp** – доля ложноположительных результатов. **AUC** – показатель интегральной оценки качества и предсказательной способности модели; **критерий** – критерий отсекающего ROC-кривой.

## ВЫВОДЫ

1. Исследовано метилирование CpG-островков 14 генов микроРНК при немелкоклеточном раке легкого. Метилирование CpG-островков девяти генов микроРНК (*mir-129-2*, *mir-203*, *mir-212*, *mir-107*, *mir-130b*, *mir-137*, *mir-125b1*, *mir-375*, *mir-1258*) исследовано в первичных опухолях НМРЛ впервые. Повышение частоты метилирования в опухолях по сравнению с гистологически нормальной тканью легкого статистически значимо для группы генов микроРНК: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c*, *mir-124a-3*, *mir-212*, *mir-129-2*, *mir-137*, *mir-125b1*, *mir-375* и *mir-1258*.
2. Идентифицирован новый локус, подверженный метилированию в опухолях, – CpG-островок, перекрывающий ген *mir-1258*. Изменение статуса метилирования шести генов микроРНК (*mir-212*, *mir-129-2*, *mir-137*, *mir-125b1*, *mir-375* и *mir-1258*) в первичных опухолях НМРЛ выявлено нами впервые, причем повышение частоты метилирования в опухолях по сравнению с гистологически нормальной тканью легкого статистически значимо..
3. Исследовано метилирование CpG-островков семи генов микроРНК в первичных опухолях толстой кишки, из них для четырёх генов (*mir-9-3*, *mir-193a*, *mir-203*, *mir-212*) впервые. Показано статистически значимое повышение частоты метилирования генов: *mir-9-1*, *mir-9-3*, *mir-34b/c* и *mir-129-2*. Профили метилирования семи генов микроРНК при НМРЛ и РТК в целом похожи, хотя для РТК характерны более высокие частоты метилирования, чем для НМРЛ.
4. Впервые выявлена статистически значимая ассоциация частоты метилирования CpG-островка гена *mir-125b1* с со стадией НМРЛ и наличием метастазов в региональных лимфоузлах, и гена *mir-137* – со стадией НМРЛ.
5. Составлены системы информативных маркеров, позволяющие с высокой чувствительностью и специфичностью определять опухоль легкого и толстой кишки, причем в панель маркеров НМРЛ входят пять генов, исследованных в первичных опухолях легкого впервые (*mir-129-2*, *mir-137*, *mir-125b1*, *mir-375* и *mir-1258*).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Ходырев Д.С., Пронина И.В., **Рыков С.В.**, Береснева Е.В., Фридман М.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Метилирование группы генов микроРНК вовлечено в регуляцию экспрессии генов-мишеней RAR-beta2 и NKIRAS1 при раке легкого. Молекулярная биология. 2012. Т.46, № 5, С.773-785.

**Рыков С.В.**, Ходырев Д.С., Береснева Е.В., Пронина И.В., Корчагина Е.Л., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Профили метилирования группы генов микроРНК в опухолях легкого, почки и толстой кишки. Медицинская генетика. 2012. Т. 11, № 8, С.26-31.

**Рыков С.В.**, Ходырев Д.С., Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Новые гены микроРНК, подверженные метилированию в опухолях легкого. Генетика. 2013. Т. 49, №7, С. 911-915.

Ходырев Д.С., **Рыков С.В.**, Пронина И.В., Казубская Т.П., Логинов В.И., Брага Э.А. Система маркеров на основе группы генов микроРНК для диагностики немелкоклеточного рака легкого, включая плоскоклеточный рак и аденокарциному, и набор праймеров для маркера miR-375 этой системы. // Патентная заявка РФ 2012 №142228 от 04.10.2012.

**Рыков С.В.**, Ходырев Д.С., Логинов В.И., Береснева Е.В., Пронина И.В., Казубская Т.П., Брага Э.А. Анализ метилирования промоторных областей генов микроРНК в опухолях толстого кишечника и легкого. Материалы 7-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения 2011». Санкт-Петербург, апрель, 2011. Приложение к Вопросам Онкологии, Т. 57, № 2, С. 54-55.

**Рыков С.В.**, Д.С. Ходырев, Е.В. Береснева, И.В. Пронина, М.В. Фридман, Т.П. Казубская, В.И. Логинов, Э.А. Брага. Метилирование группы генов микроРНК в опухолях легкого, включающих плоскоклеточный рак и аденокарциному. Материалы научной конференции «Актуальные проблемы онкогенетики», Москва, Россия, октябрь, 2011. Медицинская генетика Т. 10, № 10, 2011. С. 20-21.

Ходырев Д.С., **С.В. Рыков**, Е.В. Береснева, И.В. Пронина, М.В. Фридман, Т.П. Казубская, В.И. Логинов, Э.А. Брага. Группа генов микроРНК подверженных метилированию при раке толстого кишечника. Материалы научной конференции «Актуальные проблемы онкогенетики», Москва, Россия, октябрь, 2011. Медицинская генетика Т. 10, № 10, 2011. С. 23-24.

**Рыков С.В.**, Д.С. Ходырев, Е.В. Береснева, И.В. Пронина, Т.П. Казубская, В.И. Логинов, Э.А. Брага. Метилирование группы генов микроРНК в опухолях толстой кишки и легкого. Материалы XV Российского онкологического конгресса, Москва, Россия, ноябрь, 2011. С. 220-221.

## Список сокращений

AUC - Area Under Curve  
АД – аденокарцинома легкого  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
МРЛ – мелкоклеточный рак легкого  
МС-ПЦР – метилспецифичная ПЦР  
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого  
п.о. – пара оснований  
ПРЛ – плоскоклеточный рак легкого  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РМЖ – рак молочной железы  
РТК – рак толстой кишки