

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЛЕГКИХ

© 2015 г. Д.С. Ходырев, А.Г. Никитин, Н.С. Кулагина, А.В. Аверьянов

*Федеральный научно-клинический центр специализированных видов
медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, г. Москва*

В 21 веке остро стоит проблема поиска эффективных и дешевых методов для раннего выявления рака легких. Пациенты с подозрением на злокачественное заболевание легких, как правило, подвергаются клиническим исследованиям, таким как КТ-сканирование грудной клетки и бронхоскопия. Последнее преимущественно применяется для подтверждения диагноза. Тем не менее, даже когда признаки, симптомы и рентгенологические данные указывают на то, что клинический диагноз злокачественного заболевания легких является очевидным, требуются дополнительные инвазивные процедуры для получения биологического материала, пригодного для окончательного подтверждения наличия злокачественных клеток. В настоящее время есть четкое понимание необходимости поиска биомаркеров, способных на доклинической стадии выявлять клетки рака с помощью малоинвазивных процедур.

Ключевые слова: рак легких, биомаркеры, ДНК метилирование, микроРНК

MOLECULAR GENETIC APPROACHES IN THE DIAGNOSIS OF LUNG CANCER

D.S. Khodyrev, A.G. Nikitin, N.S. Kulagina, A.V. Averyanov

It is an acute problem for the 21st century to find effective and inexpensive methods for early detection of lung cancer. Patients, suspected of having a malignant disease of lungs, generally undergo clinical studies such as CT scans of the chest and bronchoscopy. The latter is mainly used to confirm the diagnosis. However, even when the signs, symptoms and radiological findings indicate that clinical diagnosis of malignant lung disease is evident, additional invasive procedures for obtaining the biological material suitable for the final confirmation of the presence of malignant cells are required. Currently, there is a clear understanding of the need to find biomarkers able to detect pre-clinical stage of cancer cells using minimally invasive procedures.

Key words: Lung cancer, biomarkers, DNA methylation, microRNA

В развитых странах онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности. Тяжесть заболевания и низкая выживаемость при онкопатологиях связаны, прежде всего, с поздним выявлением опухолей, и на сегодняшний день совершенно очевидна не-

обходимость новых методов диагностики и лечения, что делает проблему своевременного выявления предопухолевых изменений одной из приоритетных задач современной медицины.

Диагностика с использованием биомаркеров является наиболее распространенным ме-

тодом ранней диагностики рака. Биомаркеры – это набор биологических метрик, соответствующих уровням определенных белков, экспрессии генов, характеристикам генетических локусов или активности ферментов, характеризующих состояние организма. Известные маркеры опухолей, например, раково-эмбриональный антиген (РЭА), нейронспецифическая енолаза (NSE) и фрагмент цитокератина 19 (Cyfra-21-1), недостаточно чувствительны и специфичны. Чувствительность онкомаркеров нового поколения – молекулярно-генетических и эпигенетических, намного выше традиционных цитогенетических, биохимических и иммунохимических. Одними из таких маркеров являются метилированные промоторы генов-регуляторов и гены микроРНК, нарушение экспрессии которых способствует опухолеобразованию.

Профили метилирования генов и экспрессии микроРНК являются высокоспецифичными для рака легкого, простаты, толстого кишечника, почки, яичников, молочной железы и т.д., и их гистологических подтипов, что обусловило высокий интерес исследователей к данной тематике. Выявление онкомаркеров нового поколения является предметом многолетних и крупномасштабных научных исследований разных исследовательских групп по всему миру. В разных областях появляются данные об использовании маркеров метилирования (*mSHOX2* для рака легких и *mSEPT9* для колоректального рака), маркеров экспрессии (*PCA3* для рака простаты) и других неинвазивных методов диагностики, но исследовательские работы по поиску и использованию онкомаркеров нового поколения на данном этапе отличаются значительной вариабельностью результатов.

Существующие маркеры нового поколения были обнаружены с помощью микрочиповых технологий в 2002-2004 гг., 6-10 лет понадобилось на валидацию, клинические испытания и одобрение тест-систем для клинического использования, эти маркеры были получены с помощью статистического анализа данных первичных измерений и не отражают механизмы процессов, приводящих к развитию патологии. Поэтому данные маркеры не универсальны и обладают достаточно скромными характеристиками чувствительности и специфичности, что диктует необходимость даль-

нейшей разработки маркеров с использованием подходов системной биологии. Крупные мировые научные центры запустили проекты по поиску онкомаркеров с использованием широкого спектра технологий массового параллельного секвенирования, в данный момент идет накопление данных по большому количеству пациентов (до 500-600 образцов), анализируются экзомы, транскриптомы, метиломы, частично геномы и т.д., что позволит подойти к проблеме обнаружения биомаркеров с позиций глубокого анализа биологических взаимодействий в клетке. Консорциумы планируют завершение первичного накопления данных к 2015-2016 гг., обработку данных в 2015-2017 гг. и начало валидации новых маркеров в 2017 г, что позволит к 2020 г. выйти на растущий рынок ДНК-диагностики с новыми готовыми продуктами.

Фундаментальные исследования в России по ряду направлений (например, лейкозы) не уступают мировому уровню, по ряду других патологий запускаются проекты, но отставание от мировых достижений составляет 3-5 лет. И хотя большое число работ по поиску биомаркеров проводится с использованием современных методов анализа (секвенирование нового поколения, протеомика, метаболомика), формируются международные коллективы для анализа современных больших массивов экспериментальных данных, по-прежнему существуют проблемы с этапами валидации, внедрения и производства тест-систем. Российские работы уступают по количеству пациентов (как правило, до 50-100 образцов), охвату омиксных данных (анализируется 1-2 параметра) и глубине анализа, хотя именно России принадлежит лидерство в области инструментов для системной биологии (три из пяти лидирующих в мире программных продукта имеют российские корни – MetaCore, BioUML, GeneXplain).

Несмотря на достаточно большое количество лабораторий, получение патентов на панели маркеров, регистрацию новых медицинских технологий и высокую фундаментальную значимость полученных результатов, ни одна из отечественных оригинальных разработок не дошла до стадии производства тест-систем и внедрения в практическое здравоохранение в значимых масштабах. Связано это как с отсутствием длительных клинических испытаний,

требуемых для получения регистрационных удостоверений, так и с низкими реальными показателями чувствительности и специфичности, а также слабым взаимодействием институтов с организациями-производителями тест-систем.

Основная причина подобного положения дел – недостаточный уровень сотрудничества научных учреждений с клиническими, что приводит к низкому качеству формируемых выборок и ненадежному результату. Почти полностью отсутствует взаимодействие фундаментальной науки с технопарками, что делает неразрешимой задачу получения и закрепления патентного приоритета пригодных для внедрения результатов в этой области.

Лаборатория генетики Центра биомедицинских технологий ФНКЦ ФМБА России была создана для объединения имеющихся клинических, технологических и кадровых ресурсов для выполнения исследований в области разработки новых молекулярно-генетических подходов к диагностике онкопатологий и создания неинвазивных методов генетического профилирования опухолей. В настоящее время ведется разработка малоинвазивного способа ранней диагностики рака легкого. Проведение этого исследования позволит разработать способ ранней малоинвазивной диагностики рака легкого, основанного на изменении статуса метилирования CpG-островков, перекрывающих промоторные участки генов, вовлеченных в патогенез рака легкого. Полученные в процессе исследования данные о зависимостях между статусом метилирования изучаемых генов и клинико-патологическими свойствами опухоли легкого позволят осуществить построение прогностической модели онкозаболевания и выявлять опухоли с метастатическим потенциалом.

Рак легких является ведущей причиной смерти от рака у мужчин и женщин. Во всем мире на онкопатологию легких приходится около 13% всех случаев рака; ежегодно диагностируется более 1,1 млн случаев рака легких. Как правило, рак легких наиболее распространен в развитых странах, особенно в Северной Америке и Европе, и менее распространен в развивающихся странах, особенно в Африке и Южной Америке (Boffetta P. and Parkin D.M., 1994). В России рак легкого занимает первое место, как в общей структуре онкологических

заболеваний, так и среди злокачественных опухолей у мужчин.

Симптомы рака легких характерны для многих заболеваний органов дыхания. Тяжесть заболевания и низкая выживаемость при раке легких связаны, прежде всего, с несвоевременной диагностикой и запущенностью процесса.

В прошлом наблюдалась высокая заболеваемость онкопатологией легких в городских районах, что приводило к мысли о загрязнении воздуха как причине «эпидемии» рака легких. (Stocks P. and Campbell J.M., 1955). В современном понимании общей детерминанты риска развития рака легких наблюдается зависимость от различных канцерогенных воздействий – физических, таких как ионизирующее излучение, химических – компоненты табачного дыма, афлотоксины и т.п., и биологических, например – инфекций. Немаловажную роль играют факторы, определяющие индивидуальную восприимчивость человека, в том числе – генетическую предрасположенность (Hussain S.P. and Harris C.C., 1998). Кроме того, повышенная восприимчивость к раку легких может быть следствием заболевания легких, таких как хроническая обструктивная болезнь легких или фиброзные заболевания (Cotran R.S., et al., 1994).

В целом, масштабы постоянно увеличивающихся случаев заболевания раком легких могут быть обусловлены увеличением потребления сигарет и числа курящего населения и, как следствие, постоянного воздействия на легкие ингаляционных канцерогенов. По данным ВОЗ, употребление табака является самым значительным фактором риска развития рака легких и приводит примерно к 70% случаев смерти от рака легких (ВОЗ, 2014). Так, во всем мире 5,4 миллиона человек умирают ежегодно от рака легких, ассоциированного с курением (World Health Organization, 2008). Кроме того, не стоит забывать про так называемое «пассивное курение», увеличивающее риск развития рака легких и для некурящего населения.

Своевременная диагностика рака легких осложнена из-за различных форм данной онкопатологии. Так, одни формы характеризуются чрезвычайно высокой агрессивностью, другие показывают очень скудную клиническую картину, не позволяющую в течение длительного периода, иногда до нескольких лет,

обнаружить хоть сколько-нибудь выраженные симптомы заболевания. Важно, что выявление рака легких на 1-й клинической стадии поднимает 5-летнюю выживаемость пациентов с 10-15% до 70% (Hoffman P.C., et al., 2000).

В настоящее время стандартная диагностика рака легких основана на рентгеновском обследовании, выявляющем опухоль размером от 1 см.

Являющиеся «золотым стандартом» цитолого-гистологические методы с получением материала с помощью бронхоскопии (бронхиальный смыв) и процедуры тонкоигольной аспирации широко используются из-за легкости получения образца и минимальной травмы для пациентов. Кроме того, во многих случаях образец для исследования, полученный этими методами, является единственным доступным материалом для диагностики рака легких. К сожалению, как показывает практика, в отличие от резекционного материала, при недостаточном количестве ткани существует риск неправильной классификации, в связи с малочисленностью опухолевых клеток и отсутствием тканевой архитектуры (Field R.W., et al., 2004; Jorda M., et al., 2009; Khayyata S., et al., 2009; Stoll L.M., et al., 2010).

Для устранения недостатков инвазивных методов диагностики необходимо лучшее понимание механизмов, лежащих в основе злокачественного фенотипа рака легких, которое позволило бы выявлять его на доклинических стадиях. Кроме того, в силу неоднородности рака легких, необходима четкая идентификация его подтипа, существенно влияющего на стратегию лечения пациентов с первичным раком легкого.

Злокачественная трансформация является процессом, при котором клональная популяция клеток приобретает изменения, которые придают преимущество роста по сравнению с нормальными клетками. Многие из этих изменений происходят на генетическом уровне посредством усиления функции онкогенов или потери функции генов-супрессоров опухолей. В связи с чем становится возможным разработка методов малоинвазивной диагностики на основе генетических методов.

Известно, что геном опухолевой клетки отличается специфическое гиперметилирование регуляторных CpG-островков генов-супрессоров опухолевого роста (Jones and Baylin, 2007;

Berdasco and Esteller, 2010). Полногеномный скрининг метилированных CpG-островков показывает, что в некоторых видах опухолей гиперметилирование промоторных участков может затронуть 100-400 генов, вовлеченных в контроль клеточного цикла, апоптоза, ответа на ростовые сигналы, детоксикации, дифференцировку (Esteller, et al., 2007). К тому же, гиперметилирование ДНК в опухолевом процессе может являться тканеспецифическим событием, затрагивающим как отдельные гены, так и целые ансамбли генов, формируя специфичный портрет опухоли. Для примера, ген GSTP1, гиперметилированный в большинстве опухолей простаты, причем только в злокачественных (Jeronimo et al., 2001), меньше подвержен метилированию в опухолях молочной железы (Esteller et al., 2001) и не метилирован в опухолях других локализаций (Fraga et al., 2004). Гиперметилирование ряда генов характерно для злокачественных новообразований широкой локализации, например RASSF1A (Pfeifer and Dammann, 2005). Кроме того, профиль метилирования генов в опухолях может быть использован как маркер для определения типа новообразования, прогноза заболевания и ответа на терапию (Mulerio-Navarro and Esteller, 2008; Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011).

В настоящее время неуклонно растет количество данных, указывающих, что эпигенетические события связаны чуть ли не с каждым шагом развития и прогрессии опухоли, что приводит к осознанию того, что эпигенетические изменения в совокупности с генетическими нарушениями играют важную роль в инициации и прогрессировании опухолей человека (Baylin S.B. and Herman J.G., 2002). Считается, что эпигенетические изменения происходят на раннем этапе развития опухоли и могут предшествовать генетическим изменениям, предоставляя, тем самым, возможности ранней диагностики, профилактики и разработки эпигенетических биомаркеров (Belinsky S.A., 2004). Появление современных технологий обнаружения эпигенетических изменений во всем геноме является перспективным для разработки биомаркеров рака на ранних, доклинических стадиях (Deng D., et al., 2010).

Итак, инактивация генов-супрессоров опухоли через метилирование их промоторов является отличительным событием при раке лег-

Таблица 1.

Гены, часто метилированные при раке легкого

Ген	Хромосомная локализация	Функция гена	Частота метилирования при НМКРЛ, %
<i>RASSF1A</i>	3p21.31	Участие в клеточном цикле, апоптозе и стабилизации микротрубочек.	25–45 (Heller G., et al., 2010; Chen C., et al., 2011)
<i>DAPK</i>	9q21.33	Участие в сигнальных путях апоптоза	16–45 (Heller G., et al., 2010; Chen C., et al., 2011)
<i>RARB</i>	9p24.2	Участие в клеточном росте и дифференциации	26–45 (Chen C., et al., 2011)
<i>CDKN2A/p16INK4a</i>	9.21.3	Участие в остановке клеточного цикла в G1/S фазе	22–47 (Heller G., et al., 2010; Chen C., et al., 2011)
<i>FHIT</i>	3p14.2	Регуляция генов, необходимых для клеточного деления и индукции апоптоза	34–47 (Heller G., et al., 2010; Chen C., et al., 2011)
<i>APC</i>	5q22.2	Участие в миграции клеток и адгезии, активации транскрипции и апоптозе Негативный регулятор Wnt	30–96 (Heller G., et al., 2010; Chen C., et al., 2011)
<i>SHOX2</i>	3q25.32	Участие в росте и дифференцировке клеток	91–95 (Schmidt B., et al. 2010; Schneider K.U., et al. 2011)
<i>CDH1</i>	16q22.1	Регуляция клеточной адгезии, роста и деления	12–58 (Heller G., et al., 2010; Chen C., et al., 2011)
<i>GSTP1</i>	11q13.2	Кодируют ферменты системы детоксикации ксенобиотиков	15 (Chen C., et al., 2011)
<i>DAL1</i>	18p11.31	Участие в остановке клеточного цикла и апоптозе	55–57 (Heller G., et al., 2010)

кого и происходит на ранних этапах (Belinsky S.A., et al. 2005; Zochbauer-Muller S., et al. 2002). В предраковых и злокачественных состояниях часто наблюдается метилирование промоторных районов генов, связанных с ключевыми функциям, такими, как контроль клеточного цикла, пролиферации, апоптоза, клеточной адгезии, подвижности и репарации ДНК. Для ряда генов, приведенных в таблице 1, показано частое метилирование промоторных районов при немелкоклеточном раке легких (НМКРЛ).

Инактивация гена p16/INK4a посредством метилирования, мутирования или делеции является ранним событием в развитии рака легких (Kersting M., et al., 2000). Интересно, что некоторые исследователи наблюдали, что курение может привести к эпигене-

тической инактивации гена p16/INK4a при НМКРЛ (Yanagawa N., et al., 2002). Ген p14ARF инактивируется значительно реже – от 8% до 30% (Fischer J.R., et al., 2007; Toyooka S., et al., 2011). Для гена RASSF1A делеция или метилирование происходит в 30-40% случаях при немелкоклеточном раке легкого и в 70-100% при мелкоклеточном раке легкого (Toyooka S., et al., 2011). Гиперметилирование промотора гена FHIT при раке легких коррелирует с постановкой диагноза «рак», сосудистой инвазивностью и прогнозом (Tomizawa Y., et al., 2004; Maruyama R., et al., 2004), а оценка инактивации путем делеции или метилирования достигает 70% при немелкоклеточном раке легкого и 50-80% при мелкоклеточном раке легкого (Toyooka S., et al., 2011). Гиперме-

тирование гена CDKN2A может произойти в начале развития некоторых видов рака легких и выявляется в предраковых состояниях (Belinsky S.A., 2005). Кроме того, было показано, что метилирование промоторных районов генов RASSF1A и APC было связано с первым этапом НМРЛ (Lin Q., et al., 2009). Стоит отметить, что некоторые эпигенетические изменения были характерны при раке легких только в биологических образцах курильщиков. Так, у курильщиков наблюдается метилирование промоторных районов генов APC, FHIT и RASSF1A (Kim D.H., et al., 2001; Toyooka S., et al., 2003; Toyooka S., et al., 2004; Feng Q., et al., 2008). А экспрессия гена RARb2 часто снижалась в эпителии бронхов курильщиков. Также aberrантное метилирование этого гена значительно коррелирует с курением у пациентов с НМРЛ (Tomizawa Y., et al., 2004). Кроме того, частота метилирования промоторных районов генов p16INK4a, RASSF1A и FHIT была больше у курильщиков при немелкоклеточном раке легкого относительно некурящих (Kim D.H., et al., 2001; Kim H., et al., 2004; Vaissiere T., et al., 2009; Buckingham L., et al., 2010). Также, было показано увеличение уровня метилирования генов RARb, p16INK4a, FHIT и RASSF1A с увеличением интенсивности курения (Kim D.H., et al., 2001; Hong Y.S., et al., 2007; Andujar P., et al., 2010; Yanagawa N., et al., 2011). Однако нет никаких существенных различий по уровням метилирования ДНК между мелкоклеточным раком легких и НМРЛ, а так же между двумя основными подтипами НМРЛ, плоскоклеточным раком и аденокарциномой (Girard L., et al., 2000).

Особо стоит отметить, выявление aberrантного метилирования ДНК в мокроте (Machida E.O., et al. 2006; Leng S., et al., 2012), бронхоальвеолярном аспирате (Grote H.J., et al. 2004; Kim H., et al., 2004; de Fraipont F., et al., 2005; Schmiemann V., et al., 2005; Dietrich D., et al., 2012) и слюне (Hu Y.C., 2002; Simkin M., et al., 2012) у пациентов с раком легких, что делает это событие интересным с диагностической точки зрения. Так, клетки с аномальным метилированием генов были обнаружены в мокроте субъектов перед постановкой диагноза рака легких (Palmisano W.A., et al., 2000; Belinsky S.A., 2004). Для примера, метилирование гена CDKN2A было обнаружено в мокроте пациента за 3 года до постановки диагноза рака легких

(Palmisano W.A., et al. 2000), и генов p16INK4a, DAPK и RASSF1A за 18 месяцев до постановки диагноза рака легких (Belinsky S.A., 2006).

В настоящее время единственным доступным инструментом для выявления рака легких на доклинической стадии является коммерческая тест-система компании Epigenomics AG на основе эпигенетического маркера гена SHOX2. Данная тест-система продемонстрировала хорошую чувствительность (68%-78%) и специфичность (95%-96%) при НМРЛ (AUC, 86%-94%) (Schmidt B., et al., 2010; Dietrich D., et al., 2012). Причем, в качестве биологического образца пациента с подозрением на рак легких используется бронхоальвеолярный аспират, полученный малоинвазивным методом.

Следует сказать, что для того, чтобы повысить качество диагностики, нередко используют несколько маркеров. Так, панель маркеров на основе гиперметилирования генов p16, TERT, WT1, и RASSF1 из бронхиального аспирата позволяла выявлять рак легких с чувствительностью 82% и специфичностью 91%. Для сравнения, цитологическими методами при тех же условиях выявлялось 43% опухолей, при 100% специфичности (Nikolaidis G., et al., 2012).

Все вышесказанное указывает на огромную перспективу использования таких маркеров для доклинической диагностики, с целью отбора групп риска возникновения рака легких.

Не так давно появился новый класс онкомаркеров – микроРНК, играющих огромную роль в развитии злокачественных новообразований (Calin G.A. and Croce C.M., 2006; Farazi T.A., et al., 2011), главным образом – посредством регуляции экспрессии протоонкогенов и онкосупрессоров (Esquela-Kerscher A., 2006). Биоинформационные данные указывают на то, что одна микроРНК может связываться примерно с сотней целей мРНК и, таким образом, играет важную роль в различных биологических процессах. К примеру, mir-21 регулирует PTEN и PDCD4, проапоптотический ген, снижение экспрессии которого связано с неблагоприятным прогнозом для пациентов с аденокарциномами легкого (Mudduluru et al., 2007). Эта же микроРНК участвует в регуляции транскрипционного фактора AP-1, влияющего на экспрессию членов семейств c-Fos, c-Jun, ATF и JDP, регулирующих процессы дифференцировки, пролиферации и апоптоза

(Talotta et al., 2009). Также микроРНК может выступать в качестве онкогенов или опухолевых супрессоров (На Т.У., 2011), а подмножество этих микроРНК – показывать значительную тканевую специфичность (Lu J., et al., 2005). Так, для онкопатологий разной локализации были описаны различия в профилях экспрессии генов микроРНК между опухолевой и здоровой тканью. Эти профили имеют опухоль-специфичный характер и часто ассоциированы с клинико-патологическими свойствами опухоли (Calin and Croce, 2006; Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Например, miR-205 служит полезным маркером, отличающим ПРЛ от других подтипов НМРЛ, с чувствительностью 96% и специфичностью 90%, в том числе, гистологически трудно верифицируемых образцов (Lebanony et al., 2009).

В настоящее время существует огромное количество данных, показывающих надежную связь между микроРНК и раком (Calin G.A. and Croce, 2006), которые открывают возможность разработки новых методов диагностики, оценки риска, прогноза и лечения с использованием микроРНК. Так, высокий уровень экспрессии let-7a-2 и низкая экспрессия miR-155 позволили различать образцы ткани легкого с раком и без него (Yanaihara N., et al., 2006). Позже в плазме крови и сыворотке были найдены стабильные циркулирующие микроРНК (Mitchell P.S., et al., 2008), кроме того, были идентифицированы новые микроРНК, пригодные в качестве биомаркеров для НМРЛ (Zheng D., et al., 2011; Foss K.M., et al., 2011; Boeri M., et al., 2011). Также, установлено, что в слюне содержится много микроРНК, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров для обнаружения рака легких (Xie Y., et al., 2010). Например, избыточная экспрессия miR-21, miR-200b и miR-375, в сочетании с пониженным уровнем miR-486, способна различать больных с аденокарциномой и индивидуумов без онкопатологии в анамнезе с чувствительностью 80% и специфичностью 91,7% (Xie Y., et al., 2010), в то время как подавление miR-205, miR-210 и miR-708 предсказывает плоскоклеточный рак с чувствительностью 73% и специфичностью 96% (Xie Y., et al., 2010). Другой онкомаркер, на основе изменения экспрессии miR-34, способен обнаружить

немелкоклеточный рак легкого уже на ранних этапах у лиц без выраженных симптомов заболевания с 80% точностью (Bianchi F., et al., 2011).

Кроме того, умение различать раковые и нормальные состояния с помощью микроРНК, может также помочь в классификации патологии легких. Количество работ, посвященных выявлению различий при разных этапах онкопатологии легких на основе изменения экспрессии микроРНК, неуклонно растет (Lebanony D., et al., 2009; Landi M.T., et al., 2010). Способность правильно классифицировать различные типы онкопатологии имеет чрезвычайно важное значение, поскольку это влияет на выбор оптимальной стратегии лечения. Так, профили экспрессии генов микроРНК позволяют различить типы опухолей легкого (мелкоклеточный рак от немелкоклеточного) и подтипы НМРЛ – АД от ПРЛ (Wu et al., 2011), выявить заболевание на ранней стадии по анализу этих маркеров в плазме крови (Rep Y., et al., 2011), выделить группы пациентов с плохим прогнозом выживаемости после радикального лечения (Jassem and Skrzypski, 2012). Кроме того, системы онкомаркеров на основе профилей экспрессии микроРНК способны дифференцировать опухоли по метастатическому потенциалу (Barshack I., et al., 2010).

Заключение

Итак, пугающие масштабы постоянно увеличивающейся заболеваемости раком легких, отсутствие надежных малоинвазивных диагностических систем и, как следствие, высокая смертность среди населения, ставят задачу поиска решений для выявления рака легких на доклинических стадиях на приоритетное место современной онкологии. Совершенно очевидна необходимость постановки диагноза на ранних стадиях онкозаболевания. Все это заставляет обратиться к молекулярно-генетическим методам, позволяющим не только обойти ограничения классических методов, но и привнести в диагностику новый уровень комплексности, позволяя оценить такие клинико-патологические показатели, как стадию заболевания, оценку риска развития метастазов, ответа на химиотерапию и общий прогноз болезни.

Литература

1. ВОЗ, информационный бюллетень №297. 2014.
2. Andujar P., Wang J., Descatha A., et al. p16INK4A inactivation mechanisms in non-small-cell patients with lung cancer occupationally exposed to asbestos. *Lung Cancer*. 2010. 67. 23–30.
3. Barshack I., Lithwick-Yanai G., Afek A., et al. MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung. *Pathol. Res. Pract.* 2010. 206(8). 578–584.
4. Baylin S.B., Herman J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 2000. 16. 168–174.
5. Belinsky S.A. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2004. 4.707–717.
6. Belinsky S.A., Klinge D.M., Dekker J.D., et al. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin. Cancer Res.* 2005. 11. 6505–6511.
7. Belinsky S.A., Liechty K.C., Gentry F.D., et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. *Cancer Res.* 2006. 66. 3338–3344. 10. 600.
8. Berdasco M., Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev. Cell*. 2010. 19. 698–711.
9. Bianchi F., Nicassio F., Marzi M., et al. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol. Med.* 2011. 3(8). 495–503.
10. Boeri M., Verri C., Conte D., et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. 108(9). 3713–18.
11. Boffetta P., Parkin D.M.: Cancer in developing countries. *C.A. Cancer J. Clin.* 1994. 44.81–90.
12. Buckingham L., Penfield Faber L., Kim A., et al. PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell patients with lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2010. 126. 1630–1639.
13. Calin G.A., Croce C.M.: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*. 2006. 6. 857–866.
14. Chen C., Yin N., Yin B., et al. DNA methylation in thoracic neoplasms. *Cancer Lett.* 2011. 301. 7–16.
15. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. (eds): Robbins Pathologic Basis of Disease (5th ed). Philadelphia: WB Saunders. 1994.
16. de Fraipont F., Moro-Sibilot D., Michelland S., et al. Promoter methylation of genes in bronchial lavages: a marker for early diagnosis of primary and relapsing non-small cell lung cancer? *Lung Cancer*. 2005. 50. 199–209.
17. Deng D., Liu Z., Du Y. Epigenetic alterations as cancer diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers. *Adv. Genet.* 2010. 71. 125–176.
18. Dietrich D., Kneip C., Raji O., et al. Performance evaluation of the DNA methylation biomarker SHOX2 for the aid in diagnosis of lung cancer based on the analysis of bronchial aspirates. *Int. J. Oncol.* 2012. 40. 825–832.
19. Esquela-Kerscher A., Slack F.J. Oncomirs: microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2006. 6. 259–269.
20. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat. Rev. Genet.* 2007. 8. 286–298.
21. Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., et al. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001. 61. 3225–3229.
22. Farazi T.A., Spitzer J.I., Morozov P., et al.: miRNAs in human cancer. *J. Pathol.* 2011. 223. 102–115.
23. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., et al. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell patients with lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevent.* 2008. 17. 645–654.
24. Field R.W., Smith B.J., Platz C.E., et al.: Lung cancer histologic type in the surveillance, epidemiology, and end results registry versus independent review. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004. 96. 1105–1107.
25. Fischer J.R., Ohnmacht U., Rieger N., et al. Prognostic significance of RASSF1A promoter methylation on survival of non-small cell patients with lung cancer treated with gemcitabine. *Lung Cancer*. 2007. 56. 115–123.
26. Foss K.M., Sima C., Ugolini D., et al. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2011. 6(3). 482–488.
27. Fraga M.F., Herranz M., Espada J., et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res.* 2004. 64. 5527–5534.
28. Girard L., Zochbauer-Muller S., Virmani A.K., et al. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and nonsmall cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res.* 2000. 4894–4906.
29. Grote H.J., Schmiemann V., Kiel S., et al. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli promoter 1A in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2004. 110. 751–55.
30. Ha T.Y.: MicroRNAs in human diseases: from cancer to cardiovascular disease. *Immune Netw.* 2011. 11.135–154.
31. Heller G., Zielinski C.C., Zochbauer-Muller S. Lung cancer: from single-gene methylation to methylome profiling. *Cancer Metastasis Rev.* 2010. 29. 95–107.

32. Hoffman P.C., Mauer A.M., Vokes E.E. Lung cancer. *Lancet*. 2000. 355.479–485.
33. Hong Y.S., Roh M.S., Kim N.Y., et al. Hypermethylation of p16INK4a in Korean non-small cell patients with lung cancer. *J. Korean Med. Sci.* 2007. 22.S32–37.
34. Hu Y.C., Sidransky D., Ahrendt S.A. Molecular detection approaches for smoking associated tumors. *Oncogene*. 2002. 21. 7289–7297.
35. Hussain S.P., Harris C.C.: Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 1998. 58. 4023–4037.
36. Jassem J., Skrzypski M. Markers and methods for determining risk of distant recurrence of non-small cell lung cancer in stage I-IIIa patients. 2012. Patent US2012309638 (A1).
37. Jeronimo C., Usadel H., Henrique R., et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* 2001. 93. 1747–1752.
38. Jones P.A., Baylin S.B. The epigenetics of cancer. *Cell*. 2007. 128. 683–692.
39. Jorda M., Gomez-Fernandez C., Garcia M., et al.: P63 differentiates subtypes of nonsmall cell carcinomas of lung in cytologic samples: implications in treatment selection. *Cancer*. 2009. 117. 46–50.
40. Kersting M., Friedl C., Kraus A., et al. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J. Clin. Oncol.* 2000. 3221–3229.
41. Khayyata S., Yun S., Pasha T., et al.: Value of P63 and CK5/6 in distinguishing squamous cell carcinoma from adenocarcinoma in lung fine-needle aspiration specimens. *Diagn. Cytopathol.* 2009. 37. 178–183.
42. Kim D.H., Nelson H.H., Wiencke J.K., et al. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001. 61. 3419–3424.
43. Kim D.H., Nelson H.H., Wiencke J.K., et al. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001. 61. 3419–3424.
44. Kim H., Kwon Y.M., Kim J.S., et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004. 22. 2363–2370.
45. Kim H., Kwon Y.M., Kim J.S., et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2004. 22. 2363–2370.
46. Landi M.T., Zhao Y., Rotunno M., et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010. 16(2). 430–441.
47. Lebanony D., Benjamin H., Gilad S., et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2009. 27(12). 2030–2037.
48. Leng S., Do K., Yingling C.M., et al. Defining a gene promoter methylation signature in sputum for lung cancer risk assessment. *Clin. Cancer Res.* 2012. 18. 3387–3395.
49. Lin Q., Geng J., Ma K., et al. RASSF1A, APC, ESR1, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009. 135. 1675–1684.
50. Lu J., Getz G., Miska E.A., et al.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005. 435. 834–838.
51. Machida E.O., Brock M.V., Hooker C.M., et al. Hypermethylation of ASC/TMS1 is a sputum marker for late-stage lung cancer. *Cancer Res.* 2006. 66. 6210–6218.
52. Maruyama R., Sugio K., Yoshino I., et al. Hypermethylation of FHIT as a prognostic marker in non-small cell lung carcinoma. *Cancer*. 2004. 1472–1477.
53. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. 105(30). 10513–10518.
54. Mudduluru G., Medved F., Grobholz R., et al. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer*. 2007. 110. 1697–1707.
55. Mulero-Navarro S., Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008. 68. 1-11.
56. Nikolaidis G., Raji O.Y., Markopoulou S., et al. DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer. *Cancer Res.* 2012. 22. 5692-5701.
57. Palmisano W.A., Divine K.K., Saccomanno G. et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res.* 2000. 60. 5954–5958.
58. Pfeifer G.P., Dammann R. Methylation of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Human Tumors. *Biochemistry (Mosc.)*. 2005. 70. 576-583.
59. Ren Y., Wu Y., Lu S., et al. Compositions and methods for microRNA expression profiling in plasma of lung cancer. 2011. Patent WO2011076144 (A1).
60. Rodríguez-Paredes M., Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* 2011. 17. 330-339.

61. Schmidt B., Liebenberg V., Dietrich D., et al. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*. 2010. 10. 600.
62. Schmiemann V., Bocking A., Kazimirek M., et al. Methylation assay for the diagnosis of lung cancer on bronchial aspirates: a cohort study. *Clin. Cancer Res*. 2005. 11. 7728–7734.
63. Schneider K.U., Dietrich D., Fleischhacker M., et al. Correlation of SHOX2 gene amplification and DNA methylation in lung cancer tumors. *BMC Cancer*. 2011. 11. 102.
64. Simkin M., Abdalla M., El-Mogy M., et al. Differences in the quantity of DNA found in the urine and saliva of smokers versus nonsmokers: implications for the timing of epigenetic events. *Epigenomics*. 2012. 4. 343–352.
65. Stocks P., Campbell J.M.: Lung cancer death rates among non-smokers and pipe and cigarette smokers: An evaluation in relation to air pollution by benzopyrene and other substances. *Br. Med. J.* 1955. 2. 923–929.
66. Stoll L.M., Johnson M.W., Burroughs F., et al.: Cytologic diagnosis and differential diagnosis of lung carcinoid tumors: a retrospective study of 63 cases with histologic correlation. *Cancer Cytopathol.* 2010. 118. 457–467
67. Talotta F., Cimmino A., Matarazzo M.R., et al. An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. *Oncogene*. 2009. 28. 73–84.
68. Tomizawa Y., Iijima H., Nomoto T., et al. Clinicopathological significance of aberrant methylation of RARBeta2 at 3p24, RASSF1A at 3p21.3, and FHIT at 3p14.2 in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004. 305–312.
69. Toyooka S., Maruyama R., Toyooka K.O., et al. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*. 2003. 103. 153–160.
70. Toyooka S., Mitsudomi T., Soh J., et al. Molecular oncology of lung cancer. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2011. 59. 527–537.
71. Toyooka S., Suzuki M., Tsuda T., et al. Dose effect of smoking on aberrant methylation in non-small cell lung cancers. *Int. J. Cancer*. 2004. 110. 462–464.
72. Vaissiere T., Hung R.J., Zaridze D., et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 2009. 69. 243–252.
73. World Health Organization: WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER Package. Geneva: World Health Organization, 2008.
74. Wu Y., Lu S., Huang W., et al. Tissue-based microRNA methods for diagnosis of different subtypes of lung cancer. 2011. Patent WO2011076145 (A1).
75. Xie Y., Todd N.W., Liu Z., et al. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010. 67(2). 170–176.
76. Yanagawa N., Tamura G., Oizumi H., et al. Frequent epigenetic silencing of the p16 gene in nonsmall cell lung cancers of tobacco smokers. *Jpn. J. Cancer Res*. 2002. 1107–1113.
77. Yanagawa N., Tamura G., Oizumi H., et al. Inverse correlation between EGFR mutation and FHIT, RASSF1A and RUNX3 methylation in lung adenocarcinoma: relation with smoking status. *Anticancer Res*. 2011. 31. 1211–1214.
78. Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006. 9(3). 189–198.
79. Zheng D., Haddadin S., Wang Y., et al. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2011. 4(6). 575–586.
80. Zochbauer-Muller S., Minna J.D., Gazdar A.F. Aberrant DNA methylation in lung cancer: biological and clinical implications. *Oncologist*. 2002. 7. 451–457.

Информация об авторах:

Ходырев Дмитрий Сергеевич – с.н.с. лаборатории генетики ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, к.б.н.

Никитин Алексей Георгиевич – зав. лабораторией генетики ФНКЦ ФМБА России, к.м.н.
e-mail: avialn@gmail.com

Кулагина Наталья Сергеевна – врач-пульмонолог отделения пульмонологии ФНКЦ ФМБА России

Аверьянов Александр Вячеславович – зав. отделением пульмонологии ФНКЦ ФМБА России,
руководитель Центра биомедицинских технологий ФМБА России
e-mail: averyanovav@mail.ru