

**ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК-МАРКЕРЫ ПРИ МОНИТОРИНГЕ РАКА ЛЁГКОГО: АНАЛИЗ
СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕТРОЭЛЕМЕНТОВ LINE-1**

Л.А.Умарова, А.А. Пономарева

Научный руководитель: профессор, д.б.н. Н.В. Чердынцева
Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г.Томск, пр. Ленина, 36, 634050

Е-mail: umarova_laura95@mail.ru

**CIRCULATING DNA MARKERS IN MONITORING LUNG CANCER: ANALYSIS OF LINE-1
RETROELEMENT METHYLATION STATUS**

L.A. Umarova, A.A. Ponomaryova

Scientific supervisor: Prof., Dr. N.V. Cherdyntseva
Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

Е-mail: umarova_laura95@mail.ru

Abstract. *It is known that the violation of DNA methylation processes is one of the earliest and most common events in malignant tumors. The purpose of this study was to perform a comparative analysis of the methylation level of LINE-1 retroelements in blood cirDNA in patients with lung cancer before treatment and at the stages of dynamic observation after antitumor therapy. The study included 16 patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). The material for the study was venous blood, which was taken before the treatment (10-15 days before the start of treatment), 15-30 days after the end of the last course of non-adjuvant chemotherapy and in the postoperative period for 10-15 days. Analysis of the methylation level of LINE-1 element was performed using a quantitative methyl specific PCR. A linear increase in the methylation index of the LINE-1 fragment in response to antitumor therapy was revealed: after chemotherapy, a statistically significant increase in the methylation index was approximately 2-fold ($p = 0.04$, paired t-test), 1.4 times after operation indicators after chemotherapy ($p = 0.134$, paired t-test). As a result, after combined treatment, the LINE-1 methylation index in cc-cirDNA increased 3-fold compared to the level before treatment ($p = 0.03$, paired t-test). The obtained results indicate the prospectivity of the study on extended samples of lung cancer patients with the significance of the LINE-1 methylation index in blood cirDNA for predicting tumor response to treatment, evaluating the effectiveness of therapy and early detection of relapses.*

Введение. Известно, что при онкологических заболеваниях в составе циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухолеспецифичных aberrантно-метилованных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами [1-3]. До сих пор преимущественными мишенями анализа в цирДНК крови были гиперметилованные гены опухолевой супрессии. Однако эти гены представлены в геноме единичными копиями, поэтому непростой задачей является выявление метилированных аллелей в составе цирДНК, концентрация которой в крови невелика и составляет в среднем несколько десятков нанограммов [1, 2]. Поэтому интересным подходом представляется определение статуса метилирования мобильных элементов, которые многократно представлены в геноме человека (от нескольких копий до сотен тысяч

копий) и составляют приблизительно 45% его длины [4]. Самым крупным классом автономных ретроэлементов являются элементы LINE-1, которые составляют до 20% генома млекопитающих [5].

Целью настоящего исследования явилось проведение сравнительного анализа уровня метилирования LINE-1 ретроэлементов в цирДНК крови больных раком легкого до лечения и на этапах динамического наблюдения после противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. В исследование было включено 16 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), проходивших лечение на базе клиники Томского НИИ онкологии в возрасте 48-65 лет. Диагноз морфологически верифицирован. Все больные получали комбинированное лечение в составе 2 курсов неoadъювантной химиотерапии по схеме: паклитаксел 175 мг/м² в/в 1 день + карбоплатин АУС 6 в/в 1 день, с интервалом в 3 недели. Вторым этапом выполнялось хирургическое вмешательство (резекция легкого или пневмонэктомия). Материалом для исследования послужила венозная кровь, которая забиралась до лечения (за 10-15 дней до начала лечения), на 15-30 сутки после окончания последнего курса неадъювантной химиотерапии и в послеоперационный период на 10-15 сутки. Венозную кровь собирали в 0,05 М 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 5 мМ фосфатным буфером и 0,25% раствором трипсина, как описано ранее [2]. ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 3 мл ФБ-ЭДТА и 1 мл трипсиновой фракции с помощью наборов «Blood DNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). ДНК из ФБ-ЭДТА и трипсиновой фракций объединяли, полученные суммарные препараты представляют собой скп-цирДНК. Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с помощью наборов для выделения модифицированной ДНК «Bisulfite ssDNA Isolation Kit» фирмы «BioSilica Ltd.» (Новосибирск, Россия). Анализ уровня метилирования LINE-1 элементов проводили с использованием количественной метил-специфичной ПЦР. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Результаты. Проведен анализ корреляции концентрации метилированных фрагментов LINE met и фрагментов LINE Ind в скп-цирДНК, которые рассчитывались в геномах-эквивалентах (ГЭ) на 1 мл крови. Выявлена корреляция значений как до лечения ($r = 0,54$), так и после химиотерапии ($r = 0,72$), после операции ($r = 0,83$) ($p < 0,05$, коэффициент ранговой корреляции Спирмена), что говорит об ассоциации изменений анализируемых показателей при проведении противоопухолевого лечения. Выявлено линейное увеличение индекса метилирования фрагмента LINE-1 в ответ на противоопухолевую терапию: после химиотерапии наблюдалось статистически значимое увеличение индекса метилирования примерно в 2 раза ($p = 0,04$, парный t-тест), после операции в 1,4 раза по сравнению с показателями после химиотерапии ($p = 0,134$, парный t-тест). В итоге после комбинированного лечения индекс метилирования LINE-1 в скп-цирДНК увеличивался в 3 раза по сравнению с уровнем до лечения ($p = 0,03$, парный t-тест).

Одной из задач настоящего исследования явилась оценка характера изменений уровня метилирования LINE-1 в цирДНК крови больных НМРЛ после проведенного лечения. В зависимости от ответа опухоли на неoadъювантную химиотерапию, пациентов разделили на 2 группы – с положительным ответом (частичная регрессия опухоли) и менее выраженным ответом (стабилизация или прогрессия опухоли). Оказалось, что в этих группах увеличение индекса метилирования LINE-1 в скп-

цирДНК на этапах лечения характеризуется разными трендами. Больные с опухолью, умеренно отвечающей на терапию (группа со стабилизацией), показали более выраженное увеличение после химиотерапии, и далее незначительное увеличение после операции (23% - 39% - 45%). Больные с положительным ответом на химиотерапию (группа с регрессией) показали тенденцию к линейному увеличению индекса метилирования LINE-1 в ряду [до лечения – после химиотерапии – после операции] (16% - 28% - 44%).

После проведенной противоопухолевой терапии период наблюдения пациентов составлял не менее 5 лет. Пациенты были разделены на 2 группы: 1 – больные с неблагоприятным прогнозом (рецидивы, отдаленные метастазы) (n = 6) и 2 – больные с благоприятным прогнозом (в отсутствие признаков прогрессирования) (n = 10). Проведен однофакторный анализ общей выживаемости больных НМРЛ в зависимости от порогового значения по методу Каплана-Майера. Пороговое значение соответствовало медиане индекса метилирования LINE-1 в скп-цирДНК, определяемого до лечения. Хотя наблюдается тенденция к различию между группами, статистически значимых различий общей выживаемости в зависимости от индекса метилирования LINE-1 в скп-цирДНК крови в настоящей работе не выявлено (long-rank тест, p = 0,35). Для выявления достоверных различий необходимы исследования на расширенных выборках больных РЛ.

Заключение. Таким образом, в настоящей работе показана значимость увеличения индекса метилирования LINE-1 элементов в циркулирующей ДНК крови для мониторинга состояния больных РЛ после проведенного комбинированного лечения. Тренды изменений индекса метилирования LINE-1 в цирДНК оказались различны в сопоставлении уровня ответа опухоли на химиотерапию, что говорит об интегральной связи этого серологического маркера с патологическим процессом при РЛ. Полученные результаты говорят о перспективности исследования на расширенных выборках больных РЛ значимости индекса метилирования LINE-1 в цирДНК крови для прогноза ответа опухоли на лечение, оценки эффективности терапии и раннего выявления рецидивов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rykova E.Y., Morozkin E.S., Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2012). Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther*, no. 5, pp. 141–153.
2. Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V., Skvortsova T.E., Dobrodeev A.Y., Zav'yalov A.A., Bryzgalov L.O., Tuzikov S.A., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2013). Potentialities of aberrantly methylated circulating DNA for diagnostics and post-treatment follow-up of lung cancer patients. *Lung Cancer*, no. 81, pp. 397–403.
3. Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G.A., Pantel K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Rev Clin Oncol*. no. 11, pp. 145–156.
4. Cedar H, Bergman Y. (2012). Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem*. no. 81, pp. 97-117.
5. Федоров А.В. Регуляция транскрипции ретротранспозонов LINE-1 млекопитающих // *Цитология*. - 2008. – Т. 50. - № 12. – С. 1011-1022.