

Д.В. Залетаев^{1,2}, В.В. Стрельников¹, М.В. Немцова², О.В. Бабенко¹, Е.Б. Кузнецова^{1,2}, В.В. Землякова^{1,2}, Т.В. Кекеева², Д.С. Михайленко¹, А.С. Танас¹, В.В. Руденко¹, А.Ю. Бабаян¹, Е.А. Алексеева¹, О.А. Симонова¹

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Российская Федерация

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Российская Федерация

Структурно-функциональный анализ опухолевых геномов и разработка тест-систем для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований

Рассматриваются результаты структурно-функционального анализа молекулярно-генетических нарушений при различных злокачественных опухолях. Исследования позволили обнаружить более 20 новых маркеров для спорадического рака молочной железы, из которых сформированы тест-системы, позволяющие проводить диагностику со специфичностью 100%. Образование химерного гена *TMPRSS2/ERG4* является частым опухоль-специфическим событием, его экспрессия коррелирует с более агрессивными формами рака предстательной железы, может служить молекулярным маркером андрогенчувствительности опухолевых клеток и оценки ответа опухоли на гормональную терапию. Разработаны эффективные системы для ранней диагностики рака шейки матки и эндометрия. Мутации гена *VHL*, делеции хромосомы 3 и метилирование ряда генов позволяют прогнозировать течение и подбор эффективной терапии светлоклеточного рака почки. Для ранней диагностики, прогноза течения и рецидивирования рака мочевого пузыря определен целый ряд молекулярных маркеров. Для диагностики, прогноза и лечения опухолей мозга разработана эффективная комплексная система маркеров. Протокол молекулярно-генетического исследования позволяет обнаружить причину заболевания более чем у 90% пациентов с ретинобластомой. Для исследования аномального метилирования в опухолевых геномах разработана инновационная технология *AFLOAT*, позволяющая эффективно выявлять новые маркеры, имеющие диагностическое значение. Тест-системы молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров для ранней диагностики, прогноза течения и оптимизации терапии злокачественных новообразований показали свою эффективность, получили разрешение на использование в клинической практике и в настоящее время активно внедряются в практическое здравоохранение.

Ключевые слова: злокачественные новообразования, молекулярно-генетические маркеры, аномальное метилирование, ДНК-диагностика, тест-системы.

(Вестник РАМН. 2013; 9: 7–14)

D.V. Zaletaev^{1,2}, V.V. Strelnikov¹, M.V. Nemtsova², O.V. Babenko¹, E.B. Kuznetsova^{1,2}, V.V. Zemlyakova^{1,2}, T.V. Kekeeva², D.S. Mikhaylenko¹, A.S. Tanas¹, V.V. Rudenko¹, A.Yu. Babayan¹, E.A. Alekseeva¹, O.A. Simonova¹

¹ Research Centre for Medical Genetics of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russian Federation

Structural and Functional Analysis of Tumor Genomes and the Development of Test Systems for Early Diagnosis, Prognosis and Cancer Therapy Optimization

The article discusses results of the structural and functional analysis of molecular genetic abnormalities in various malignant tumors. Investigations have discovered more than 20 new markers for sporadic breast cancer. Several of them formed the test system, allowing the diagnosis with a specificity of 100%. Appearance of *TMPRSS2/ERG4* chimeric gene is a frequent tumor-specific event, its expression is correlated with more aggressive forms of prostate cancer, may serve as a molecular marker for tumor cells and androgen assessment of tumor response to hormonal therapy. The effective systems for the early diagnosis of cervix and endometrium cancer were developed as well. Mutations in the *VHL*, deletions of chromosome 3 and methylation of several genes can predict the course and selection of effective therapy of clear cell kidney cancer. A number of molecular markers were identified for early diagnosis and prognosis of recurrence of bladder cancer. For diagnosis, prognosis and treatment of brain tumors we developed an effective complex system of markers. Protocol of molecular genetics investigation reveals the cause of the disease by more than 90% of patients with retinoblastoma. In order to study abnormal methylation in tumor genomes an innovative technology *AFLOAT* has been developed that allows to efficiently identify new markers with diagnostic value. Test systems of molecular genetic and epigenetic markers for early diagnosis and prognosis as well as for cancer therapy optimization have shown to be effective, have been approved for use in clinical practice and are being introduced into practical healthcare.

Key words: malignant tumors, molecular genetic markers, abnormal methylation, DNA diagnostics, test-systems.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 9: 7–14)

Введение

Злокачественные новообразования устойчиво занимают 2-е место среди причин смертности населения Российской Федерации. Их удельный вес в общей структуре смертности составляет около 14%. Смертность населения от онкологических заболеваний в России в 2011 г. составила 204,6 на 100 тыс. населения. Более 40% впервые регистрируемых онкологических больных имеют уже III–IV стадию заболевания, что обуславливает высокий показатель одногодичной летальности (27,4%) [1]. В связи с этим исследование молекулярно-биологических причин возникновения рака является одной из наиболее актуальных задач молекулярной медицины.

Поскольку частота онкопатологии постоянно повышается, а возраст манифестации заболевания уменьшается, большую актуальность приобретает проспективная диагностика онкопатологии в рамках ежегодных диспансеризаций и в группах риска. К структурным или генетическим маркерам относят все нарушения, которые изменяют структуру ДНК. В первую очередь, это крупные аномалии, такие как делеции целых хромосомных районов, содержащих гены-супрессоры опухолевого роста, и дубликации или амплификации районов, содержащих клеточные протоонкогены, факторы роста и др. К структурным перестройкам относят транслокации и инверсии хромосомного материала, в результате которых могут образовываться химерные гены, имеющие онкогенные функции. К структурным аномалиям относят и различные типы мутаций, которые могут активировать протоонкогены или инактивировать гены-супрессоры.

К функциональным маркерам принадлежат все нарушения, которые не связаны с изменениями структуры ДНК, но приводят к изменениям в уровне экспрессии генов, участвующих в процессах канцерогенеза. Профиль экспрессии генов в опухоли кардинально изменен по сравнению с нормальной тканью, поэтому определенные сочетания генов, теряющих свою экспрессию или, наоборот, гиперэкспрессирующихся в определенном типе опухоли, могут являться диагностическими и прогностическими маркерами. Изменения в экспрессии гена без изменения его нуклеотидной структуры относят к эпигенетической регуляции. Примером служат метилирование регуляторных районов генов, участвующих в апоптозе, ангиогенезе, дифференцировке, репарации ДНК, метастазировании, передаче сигнала, детоксикации, лекарственной резистентности и др. Аномальное метилирование CpG-островков в промоторных районах генов приводит к их инактивации. Таким образом, при отсутствии каких-либо структурных изменений нуклеотидной последовательности гена он теряет свою активность. Определение аномального метилирования генов, отвечающих за общие и частные пути регуляции жизнедеятельности злокачественной клетки, может показать, как далеко зашел опухолевый процесс, насколько интенсивно идет рост опухоли и процесс метастазирования. Идентификация генов, демонстрирующих высокую частоту метилирования в определенном типе опухоли, — это необходимый шаг в ее характеристике: специфические дополнительные регуляторные механизмы нарушаются именно в опухоли определенного типа и позволяют использовать профиль метилирования в сочетании с другими молекулярно-генетическими данными в качестве маркера. Мониторинг молекулярных маркеров, которые обнаруживают задолго до появления клинических симптомов, позволяет

вовремя провести более тщательную диагностику и превентивную терапию. Современные методы молекулярной биологии дают возможность эффективно выполнять комплексный анализ определенного типа опухоли и ДНК-диагностику для конкретного пациента. Системы молекулярных маркеров позволяют определить начальные стадии, прогноз развития заболевания, подобрать оптимальную тактику лечения и разработать таргетные терапевтические средства. Практической реализацией фундаментальных исследований стала разработка диагностических и лечебных протоколов, основанных на молекулярно-биологических технологиях.

Иновационные методы поиска дифференциального (аномального) метилирования в опухолевых геномах

Для скрининга дифференциального метилирования ДНК в научных и диагностических приложениях разработана технология анализа, ориентированного на длину амплифицируемых фрагментов (Amplified Fragment Length Oriented Analysis Technique, AFLOAT), — пример сочетания современных методов молекулярно-биологического и математического анализа с возможностями биоинформатики. Для формирования пула анализируемых фрагментов ДНК применен метод амплификации интерметилированных сайтов (АИМС). Однако в отличие от АИМС, использующего радиоавтографию для визуализации дифференциально метилированных фрагментов, мы применили разделение флуоресцентно меченых продуктов амплификации капиллярным электрофорезом. Таким образом, результаты АИМС фактически переходят в плоскость цифровой информации, доступной для компьютерного анализа без предварительной оцифровки сигнала. Для предсказания всех возможных продуктов АИМС разработана компьютерная программа «AIMS *in silico*», позволяющая осуществлять обоснованный дизайн экспериментов с учетом целей исследований и доступности оборудования и анализировать результаты с учетом геномной локализации дифференциально метилированных фрагментов ДНК [2].

Анализ продуктов AFLOAT на электрофореграммах осуществляется относительно двух референсных систем. Первая представляет собой стандартный набор фрагментов определенной массы ДНК-маркера, традиционно используемый при фрагментном анализе ДНК капиллярным электрофорезом. Второй референс выражается полным набором всех продуктов амплификации, получаемых с геномной ДНК (полная репрезентация). Первая референсная система обеспечивает позиционирование продуктов реакции по длинам в нуклеотидах, вторая дает возможность соотнести аномально метилированные фрагменты ДНК, обнаруженные в анализируемом образце, с конкретными, заранее определенными локусами генома.

На сегодняшний день адаптер-опосредованная ПЦР, в частности в формате AFLOAT, представляет собой оптимальный подход к многолокусному метилчувствительному анализу ДНК, полностью лишенный проблем, связанных с перекрестной гибридизацией обогащенных цитозинном и гуанином участков ДНК со сниженной информативностью нуклеотидных последовательностей. Это эффективная и малозатратная технология поиска новых маркеров метилирования [2–4].

Разработка системы ДНК-маркеров для диагностики и прогноза спорадического рака молочной железы

Первое место в структуре смертности от онкологических заболеваний у женщин занимает рак молочной железы (РМЖ). Он характеризуется крайне разнообразным клиническим течением: от агрессивного до вялотекущего с поздним и редким метастазированием. Выраженная гетерогенность на клиническом, гистопатологическом и молекулярном уровнях обусловила наличие многочисленных маркеров заболевания, которые не всегда обеспечивают достаточный уровень эффективности диагностики. Это объясняет необходимость разработки более современных мультигенных панелей маркеров, в т.ч. и панелей маркеров метилирования. Использование оптимизированного метода непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов в исследованиях РМЖ привело к выявлению ряда новых маркеров. В частности, нами впервые установлена эпигенетическая инактивация гена калиевого канала семейства *Eag 1 (KCNH2)* [5] и охарактеризован определенный район CpG-островка гена *BIN*, подвергающийся метилированию в опухоли [6]. Дифференциальное метилирование при РМЖ впервые показано для 15 генов и четырех межгенных областей на хромосомах 1p33, 5p15.33, 12q13.13 и 13q32.1. Впервые продемонстрированы ассоциации метилирования CpG-острков генов *SH3KBPI*, *PHF15*, *GPC2* и *LAMB1* с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ (степенью злокачественности, размером и иммуногистохимическим статусом эстрогеновых рецепторов). Определено число маркеров метилирования, необходимое и достаточное с точки зрения молекулярной классификации образцов клинического материала. В частности, в системе из 7 маркеров для постановки диагноза «Рак молочной железы» достаточно обнаружения 4 маркеров в метилированном состоянии; наличие 1–3 маркеров характерно для прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани; в здоровой ткани молочной железы не выявляется метилирования ни одного из маркеров системы. Указанные параметры позволяют проводить диагностику со специфичностью 100% [7].

Разработка системы ДНК-маркеров для диагностики, прогноза и лечения рака предстательной железы

В структуре онкологических заболеваний рак предстательной железы (РПЖ) занимает 2–3-е место после рака легких и желудка. Вместе с тем смертность от РПЖ среди прочих онкологических заболеваний занимает 3-е место у мужчин после рака легкого и рака толстой кишки. Именно поэтому актуален вопрос раннего обнаружения молекулярных маркеров опухоли, отражающих ее прогрессию, способность к метастазированию и возможности эффективного лечения.

Гомо- и гетерозиготные делеции являются одними из самых частых генетических нарушений при РПЖ, и для их детекции может быть использован микросателлитный анализ потери гетерозиготности (ПГ) и микросателлитной нестабильности (МН). Идентификация ПГ/МН эффективна для диагностики и прогноза РПЖ. Нами разработана система молекулярных маркеров для определения ПГ и МН хромосомных районов 13q14 и 16q23 в биопсийных образцах больных с заболеваниями предстательной железы с целью обнаружения пациентов с начальными стадиями РПЖ, а также для прогноза гистологически подтвержденного РПЖ. Определены статистически до-

стоверные корреляции аллельных делеций локуса 16q23 в опухолевом эпителии со степенью дифференцировки опухоли, стадией злокачественного процесса и наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы. При исследовании ПГ/МН локуса 13q14 обнаружены достоверные корреляции с более ранними стадиями РПЖ [8, 9].

Особенностью канцерогенеза РПЖ является образование химерных онкогенов, приводящих к активации факторов транскрипции семейства ETS. Исследования последних лет привели к открытию химерных генов при РПЖ, образованных слиянием 5'-нетранслируемой области гена *TMPRSS2* и генов семейства транскрипционных факторов ETS, таких как *ERG4*, *ETV1* и *ETV4*. Простатспецифические промоторные элементы химерных онкогенов *TMPRSS2/ETS* обеспечивают их высокую стойкую экспрессию, запуская процессы пролиферации и трансформации клеток в предстательной железе. Наши исследования показали, что образование химерного гена *TMPRSS2/ERG4* является частым опухолевоспецифическим событием, экспрессия данного транскрипта коррелирует с более агрессивными формами заболевания и может служить молекулярным маркером РПЖ, андрогенчувствительности опухолевых клеток и маркером оценки ответа опухоли на гормональную терапию. Преимущество данного маркера состоит в возможности работать с образцами опухоли без выполнения микродиссекции, несмотря на выраженную гетерогенность РПЖ. Предложен способ определения экспрессии химерного онкогена *TMPRSS2/ERG4* и других методом ОТ-ПЦР [8, 10].

У пациентов с РПЖ обнаружен высокий процент метилирования малигнизированного эпителия. Высокие частоты метилирования установлены для аденокарциномы: *P16* — 50%, *GSTP1* — 93%, *N33* — 27%. В железах простатической интраэпителиальной неоплазии высокой степени у пациентов с РПЖ частота метилирования изученных генов близка к таковым в железах аденокарциномы: *P16* — 53%; *GSTP1* — 73%; *N33* — 27%. Молекулярно-генетические изменения при простатической интраэпителиальной неоплазии соответствуют таковым при раннем инвазивном раке, хотя и менее выражены.

Для исследования возможности неинвазивной диагностики проведен анализ метилирования генов *P16*, *N33* и *GSTP* в 112 образцах плазмы крови пациентов с РПЖ и пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, чтобы оценить диагностический потенциал выбранных эпигенетических маркеров. Образцы крови получены от пациентов с РПЖ до выполнения простатэктомии. Метилирования гена *GSTP1* у пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы не обнаружено, в то же время для пациентов с аденокарциномой частота метилирования *GSTP1* в плазме составила 28%. В плазме пациентов с предраковыми состояниями метилирование *P16* не установлено, тогда как частота его метилирования в плазме пациентов с аденокарциномой составила 19%. Частота метилирования *N33* = 30%.

Эффективность любого биологического маркера определяется параметрами чувствительности и специфичности. Эти критерии очень важны при оценке диагностической значимости маркеров для популяционного скрининга данного заболевания или для клинического наблюдения группы повышенного риска. Система молекулярных маркеров, состоящая из 3 генов, обладает 75% чувствительностью и 100% специфичностью. При обнаружении аномального метилирования хотя бы 2 генов делают вывод о наличии заболевания [11].

Разработка системы ДНК-маркеров для ранней диагностики рака шейки матки и эндометрия

Рак шейки матки (РШМ) — одна из наиболее распространенных форм онкологической патологии у женщин, занимающая 3-е место после рака молочной железы и яичников. Развитию РШМ предшествуют предраковые изменения, которые включают цервикальную интраэпителиальную неоплазию (CIN) I, II и III степени (тяжелая дисплазия и карцинома *in situ*), поэтому в диагностических и прогностических целях необходимо использовать системы молекулярных маркеров, которые позволяют определить вероятность перерождения дисплазии шейки матки в злокачественную опухоль.

Высокая частота гиперметилирования определена для генов *P16*, *MLH1*, *HIC1* и *N33* при CIN II–III степени. В образцах ткани шейки матки, смежной с дисплазией, но морфологически не отличающейся от нормы, установлена частота метилирования, близкая к частоте диспластических образцов. Высокий уровень метилирования в морфологически не измененной ткани указывает на то, что молекулярные методы являются более строгим контролем наличия или отсутствия злокачественных изменений в тканях, чем цитологические.

Для оценки диагностической значимости маркеров метилирования (*P16*, *MLH1* и *N33*) были рассчитаны их чувствительность и специфичность. Наибольшая чувствительность определена для гена *P16* (54%), а наибольшая специфичность — для гена *N33* (100%). Аномальное метилирование *N33* выявлено только в образцах CIN II–III степени. Система маркеров из 3 генов обладает 85% чувствительностью и специфичностью [12, 13]. Расширение панели маркеров позволило установить, что частота аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста (*MLH1*, *HIC1*, *RASSF1A*, *MGMT*, *N33* и *CDH1*) возрастает в ряду: доброкачественные процессы шейки матки → CIN I → CIN II → CIN III → карцинома *in situ* [14]. При этом частота аномального метилирования генов-супрессоров опухолевого роста (*RASSF1*, *MLH1*, *P16*, *RAR- β* , *GSTP1*, *CDX1*) при исследовании патологических процессов в эндометрии возрастает в ряду: хронический эндометрит → простая гиперплазия эндометрия без атипии → комплексная гиперплазия эндометрия без атипии → полип эндометрия → комплексная гиперплазия эндометрия с атипией → рак эндометрия [15]. Указанные системы маркеров метилирования могут быть эффективно использованы в качестве дополнительного инструмента в предиктивной диагностике злокачественных новообразований женской репродуктивной системы.

Разработка системы ДНК-маркеров для диагностики, прогноза и лечения светлоклеточного рака почки

Ежегодно в мире регистрируют около 200 тыс. новых случаев рака почки и 100 тыс. смертей от этого заболевания, что позволяет считать его одной из основных проблем современной онкоурологии. Несмотря на то, что у 75% больных рак почки выявляют на стадии локализованного опухолевого процесса, в 20% случаев заболевание характеризуется как местно распространенное, и почти у 1/2 пациентов после хирургического лечения впоследствии развиваются метастазы. В связи с этим актуальным является вопрос диагностики молекулярных маркеров первичной опухоли, отражающих ее прогрессию, способность к метастазированию и возможностей эффективного лечения. Развитие светлоклеточного рака

почки (СРП) сопряжено с множественными генетическими нарушениями, наиболее характерное из которых — потеря гетерозиготности в областях локализации генов-супрессоров *VHL*, *RASSF1* и *FHIT* на коротком плече хромосомы 3. Способность опухоли к метастазированию во многом определяется отсутствием контактного торможения, что обусловлено инактивацией гена Е-кадгерина (*CDH1*). В 60% инактивация *CDH1* происходит вследствие аномального метилирования промоторного района гена. Нами показано, что множественные аллельные делеции генов на коротком плече хромосомы 3, вовлекающие 2 и более указанных генов-супрессоров, и метилирование промотора *CDH1* ассоциированы с прогрессией первичной опухоли и ее способностью к метастазированию. Наряду с другими тестами исследование необходимо при назначении адьювантной иммунотерапии после органосохраняющих операций при локализованном и местнораспространенном СРП [16, 17].

В последние годы при лечении метастатического рака почки применяют таргетные препараты, представляющие собой ингибиторы определенных тирозинкиназ или факторов роста. Наиболее универсальным в классе таргетных препаратов является сорафениб, который обладает активностью мультикиназного ингибитора. Ключевые мишени сорафениба (VEGFR 1-го и 2-го типа, PDGFR) гиперэкспрессируются в ответ на инактивацию гена *VHL*. Белковый продукт гена *VHL* необходим для сборки убиквитин-лигазного комплекса, в котором осуществляется деградация гипоксией индуцируемого фактора α (HIF-1 α). Инактивация *VHL* приводит к накоплению в клетке HIF-1 α . Избыточное количество HIF-1 α активирует транскрипцию генов-мишеней (*VEGF*, *PDGF* и их рецепторов, *TNF α* и другие), многие из которых участвуют в положительной регуляции клеточной пролиферации. Инактивация гена *VHL* встречается только при СРП, на долю которого приходится около 80% случаев рака почки. Нами показано, что биаллельные молекулярно-генетические нарушения *VHL*, приводящие к его инактивации, встречаются в 70% светлоклеточных карцином; чаще всего это комбинации мутации или метилирования с протяженной аллельной делецией (потерей гетерозиготности). Причем мутации и метилирование являются специфическими признаками инактивации гена в СРП. Показано, что более выраженный эффект применения сорафениба достигается у пациентов с мутациями *VHL* в первичной опухоли по сравнению с больными без мутаций. Таким образом, для пациентов с СРП, у которых имеются мутации и/или метилирование *VHL*, терапия сорафенибом представляется оптимальной [16, 18].

Разработка системы ДНК-маркеров для диагностики, прогноза и лечения рака мочевого пузыря

Рак мочевого пузыря (РМП) составляет 70% всех опухолей мочевого тракта и 4% случаев всех онкологических заболеваний. Ежегодно в России регистрируют до 13 тыс. новых случаев РМП. На момент установления диагноза у 80% больных имеет место поверхностный рак мочевого пузыря (ПРМП), т.е. рак с инвазией не глубже подслизистого слоя (по классификации опухолей: pT_a, pT₁, pT_{is}), остальные 20% приходится на инвазивный рак мочевого пузыря (ИРМП), который имеет различную глубину поражения мышечных слоев стенки мочевого пузыря и прилежащих органов (T₂–T₄). По сравнению с ПРМП ИРМП характеризуется более агрессивным течением и высокой смертностью. Стандартная лечебная

тактика при ПРМП заключается в трансуретральной резекции опухоли и внутривидовой химио- и иммунопрофилактике. Однако до 85% ПРМП рецидивируют после лечения, причем в 30% развиваются в инвазивные и диссеминированные формы рака, снижается степень дифференцировки опухолевых клеток. Прогнозирование клинического течения ПРМП и его трансформации в инвазивные формы — важная задача клинической и молекулярной онкологии.

С целью определения адекватной тактики лечения ПРМП Европейским обществом по изучению и лечению рака (ЕОПР) была разработана система балльной оценки рисков рецидивирования и прогрессирования. Однако разделение опухолей по морфологическим характеристикам не полностью отражает клинический потенциал ПРМП, поэтому в последние годы большое внимание уделяют поиску дополнительных факторов прогноза течения заболевания. Выявление молекулярно-генетических изменений и использование их в качестве маркеров, определяющих характер и прогноз заболевания, является оптимальным [19].

Проведено комплексное исследование широкого спектра молекулярно-генетических повреждений на материале от 163 пациентов с установленным диагнозом РМП. В результате определена группа молекулярно-генетических изменений, коррелирующих с фенотипом опухоли и, следовательно, являющихся маркерами течения злокачественного процесса. В частности, делеция локуса 9p21 в клетках первичной уротелиальной карциномы служит маркером высокого рецидивного потенциала со специфичностью 94% и чувствительностью 38%, диагностическая эффективность составляет 0,66. Выявление делеции локусов 17p13 и 9q34 и метилирования гена *P16* у пациентов с ПРМП свидетельствует о высоком инвазивном потенциале опухоли и является маркером крайне неблагоприятного течения заболевания. Объединение этих нарушений в систему позволяет повысить специфичность, чувствительность и диагностическую эффективность системы в целом: специфичность системы маркеров составляет 72%, чувствительность — 71%, диагностическая эффективность — 0,72. Делеции локуса 3p14 и метилирование гена *P16* достоверно чаще встречаются в группе опухолей с низкой степенью дифференцировки. В результате специфичность такой системы маркеров составляет 85%, чувствительность — 58%, диагностическая эффективность — 0,72. Мутации в гене *FGFR3* являются прогностическим признаком, ассоциированным с более благоприятным течением заболевания. Специфичность маркера составляет 89%, чувствительность — 38%, диагностическая эффективность — 0,64.

При анализе метилирования генов *RASSF1A*, *P16*, *P14*, *RARβ2* и *CDH1* установлена статистически достоверно повышенная частота аномального метилирования гена *P16* в ИРМП по сравнению с ПРМП. При оценке частоты метилирования в целом показано, что частота эпигенетических событий в группе ИРМП значительно выше по сравнению с ПРМП. Предложенные ДНК-маркеры могут использоваться в дополнение к применяемым диагностическим методам (гистологическому и биохимическому) [20].

Применение системы молекулярно-генетических маркеров в клинической практике позволит выделить опухоли с различным клиническим течением, отличать опухоли с высоким риском рецидивирования и прогрессирования от менее агрессивных новообразований, персонализировать прогноз заболевания и применять дифференцированный лечебный подход.

Разработка системы ДНК-маркеров для диагностики, прогноза и лечения злокачественных опухолей мозга

Частота возникновения глиом, наиболее распространенных первичных опухолей головного мозга, составляет 7–12 случаев на 100 тыс. населения. Согласно классификации экспертов Всемирной организации здравоохранения, выделяют 3 главных гистологических типа опухолей — астроцитомы, олигодендроглиомы и смешанные олигоастроцитомы, каждый из которых имеет свою характерную гистологическую картину. Частота встречаемости каждого из 3 подтипов глиом низкой степени злокачественности точно не известна. За последнее время частота олигодендроглиом постепенно возросла от традиционных 5 до 25–30% среди всех глиальных опухолей и, соответственно, снизилась для астроцитом. Это изменение показывает, что некоторые опухоли, классифицируемые ранее как астроцитомы, сейчас рассматриваются как олигодендроглиомы или смешанные олигоастроцитомы [21]. Современная морфологическая классификация глиом остается неудовлетворительной. Во-первых, анализ биоптата не всегда достоверен из-за гетерогенности опухоли по своему составу, что может привести к диагностически ошибочной пробе и неправильному определению ее типа. Во-вторых, воспроизводимость данных во время и между наблюдениями для дифференцирования астроцитарных и олигодендроглиальных опухолей или выявления анапластических астроцитов часто неудовлетворительна. Перспектива повышения воспроизводимости лежит в определении облигатных маркеров астроцитарных и олигодендроглиальных линий. В-третьих, опухоли, обладая общими морфологическими чертами, могут отличаться друг от друга на генетическом уровне и иметь различное течение, несмотря на сходство традиционных прогностических факторов. Таким образом, улучшается понимание того, что проведение молекулярно-генетического анализа вскоре станет так же важно, как и определение морфологических критериев, что повысит качество классификации глиом. В связи с этим важным достижением стала генетическая классификация анапластических олигодендроглиом, которые могут быть разделены на подгруппы, значительно отличающиеся друг от друга частотой возникновения, длительностью ответа на химиотерапию, продолжительностью жизни больных, и при этом иметь общую морфологию. В самой благоприятной группе (50%) с утратой аллелей 1p и 19q ответ на химиотерапию прокарбазином, ломустинном и винкристином приближается к 100% с продолжительностью жизни от постановки диагноза более 10 лет. Такие положительные результаты ставят вопрос об отсроченном проведении лучевой терапии, что позволило бы избежать или задержать развитие побочных эффектов. В группе с худшим прогнозом (25%) генетический профиль схож с таковым первичной глиобластомы (амплификация *EGFR*, делеции 10q и 9p21, мутации *PTEN* без утраты хромосомы 1p или с мутацией гена *TP53*), хотя опухоли соответствуют гистологическим критериям анапластических олигодендроглиом. Такой генетический статус ассоциируется с плохим прогнозом, ответом на химиотерапию в 18% случаев и средней продолжительностью жизни 16 мес. Эта группа, возможно, принадлежит той же категории, что и глиобластомы с олигодендроглиальным компонентом, и требует немедленного проведения лучевой терапии. Таким образом, анапластические олигодендроглиомы — это неоднородная группа опухолей, и их лечение должно проводиться с учетом генетического профиля. Нами разработана панель маркеров для диа-

гностики делеций 1p/19q методом анализа потери гетерозиготности микросателлитных маркеров, включающая в себя полиморфные локусы *DIS1635*, *DIS3669*, *DIS407*, *D19S562*, *D19S400* и *D19S559* [22].

В настоящее время проводятся исследования по идентификации прогностических маркеров благоприятного ответа опухоли на терапию темозоломидом. Пациенты с глиобластомами, у которых опухолевые клетки имеют метилированный промотор *MGMT*, лучше отвечают на терапию темозоломидом. По данным литературы, пациенты с мультиформной глиобластомой, получавшие лечение темозоломидом на фоне лучевой терапии, при наличии метилированного промотора *MGMT* имели общую выживаемость 21,7 мес, а при его отсутствии — 15,3 мес. Ген *MGMT*, расположенный на хромосоме 10q26.3, кодирует белок репарации ДНК, удаляющий алкильные (метильные) группы из позиции O₆ гуанина. Метилирование гуанина в позиции O₆ приводит к мутациям типа транзиций, формированию одно- и двунитевых разрывов ДНК и, в конечном счете, к выходу клетки в апоптоз. Репарационная активность каждой молекулы белка *MGMT* приводит к ее полной инактивации; после акта переноса метильной группы инактивированная молекула *MGMT* подлежит утилизации в клетке.

Активность *MGMT* в клетках злокачественных новообразований в значительной степени определяет эффективность лечения алкилирующими агентами: высокая активность *MGMT* формирует резистентный фенотип опухоли. Метилирование промотора *MGMT* приводит к инактивации этого гена и повышению чувствительности опухоли к алкилирующим препаратам. Альтернативным механизмом инактивации гена *MGMT* может служить делеция содержащего его локуса 10q26.3, определяемая как потеря гетерозиготности расположенных в этой области микросателлитных маркеров. Поскольку анализ аллельного состояния локуса 10q26.3 до сих пор не является рутинным тестом для определения чувствительности опухолей головного мозга к темозоломиду ни в России, ни за рубежом, нами разработан эффективный способ сочетанного определения делеций и метилирования гена [23].

Разработка диагностического протокола для ретинобластомы

Ретинобластома (РБ) — опухоль сетчатки глаза, характеризуется высокой степенью злокачественности, инвазивностью и способностью быстро метастазировать в соседние органы и ткани. Опухоль возникает внутриутробно или развивается в первые 2–3 года жизни. Наблюдается постоянный рост частоты РБ в популяции, которая в настоящее время составляет 1 случай на 13–15 тыс. живых новорожденных.

Эффективное лечение и сохранение жизни ребенка возможны только при условии ранней диагностики заболевания, поэтому разработка методов, позволяющих

своевременно диагностировать и прогнозировать течение болезни, является важной задачей. Комплексное молекулярно-генетическое исследование молекулярной патологии в гене *RBI* у пациентов с различными формами РБ показало, что мутации гена *RBI*, в т.ч. ранее не описанные, обнаружены в 72% случаев, делеции гена выявлены в 71% опухолей, функциональная патология гена установлена в 27%, а функциональная патология гена *P16*, регулирующего активность *RBI*, — в 17% случаев. Комплексное молекулярное исследование обнаруживает патологические события, приводящие к развитию РБ более чем у 90% пациентов с РБ. ДНК-диагностический протокол для пациентов с РБ включает скрининг мутаций методом прямого секвенирования, поиск делеций методом микросателлитного анализа в гене *RBI*, исследование статуса метилирования промоторных областей генов *RBI* и *P16* методом метилчувствительной ПЦР. Комплексная молекулярная диагностика проведена более чем 240 пациентам и членам их семей. Наследственный характер мутаций подтвержден более чем в 30% случаев, а в 21 случае была проведена успешная пренатальная диагностика [24, 25].

Заключение

Разработка стандартных наборов ДНК-маркеров для наиболее часто встречающихся онкологических заболеваний позволяет эффективно проводить скрининг и бороться с онкопатологией на самых ранних этапах ее возникновения, осуществлять мониторинг заболевания в периоды ремиссий, обнаруживать микрометастазы во время лечения и определять терапевтическую тактику в случае инактивации или гиперэкспрессии генов. Ранняя и эффективная диагностика с использованием систем молекулярных маркеров позволяет избежать инвалидизации, снизить затраты на лечение без снижения результативности. Благодаря подбору систем молекулярных маркеров и оптимизации всех этапов молекулярной диагностики стоимость анализа на практике оказывается более чем на порядок ниже, чем у соответствующих аналогов за рубежом, что особенно существенно для клинического использования. Вместе с тем по простоте и скорости исполнения, чувствительности, достоверности и надежности получаемых результатов предложенные разработки не только не уступают, но превосходят уровень мировых стандартов.

Внедрение в научные исследования современных технологий секвенирования нового поколения и биоинформационного анализа, позволяющих анализировать геном, экзом, метилом, транскриптом опухолевых клеток и клеток микроокружения, даст возможность более эффективно выявлять новые молекулярные маркеры, разрабатывать диагностические системы нового поколения, получать новые знания о патогенезе онкологических заболеваний, что приведет к идентификации новых молекулярных мишеней для разработки таргетных препаратов.

REFERENCES

1. *Strategii razvitiya meditsinskoy nauki v Rossiyskoy Federatsii na period do 2025 goda. Rasporyazhenie Pravitel'stva RF ot 28.12.2012 № 2580-r* [The Strategy for the Development of Medical Science in the Russian Federation for the Period up to 2025. Edict of the Russian Federation Government dated Dec 28, 2012 No. 2580-p].
2. Tanas A.S., Shkarupo V.V., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening. *Epigenomics*. 2010; 2 (2): 325–333.
3. Rudenko V.V., Tanas A.S., Strelnikov V.V., Kuznetsova E.B., Zaletaev D.V. *Skrining anomal'nogo metilirovaniya DNK na osnove metoda amplifikatsii intermetilirovannykh saytov*

- dlya diagnostiki zlokachestvennogo opukholevogo protsessa. *Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya. Razreshenie FS № 2011/132 ot 27.05.2011 g* [Screening of an Abnormal DNA Methylation on the Basis of Amplification Method of the Inter-methylated Sites for a Diagnosis of Cancerous Neoplastic Process. New medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2011/132 dated May 27, 2011]. Moscow, 2011.
4. Rudenko V.V., Tanas A.S., Kuznetsova E.B., Strelnikov V.V., Zaletaev D.V. *Sposob formirovaniya paneley markerov metilirovaniya DNK*. [Forming Method of the Panels of Markers of the DNA Methylation. Invention Patent No. 2472859, priority May 18, 2011]. Moscow, 2011.
 5. Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Larin S.S., Zemlyakova V.V., Babenko O.V., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. *Mol. Biol. (Moskva)*. 2007; 41 (4): 624–633.
 6. Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Larin S.S., Zemlyakova V.V., Khomyakova A.V., Babenko O.V., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. *J. Carcinogen*. 2007; 6: 9.
 7. Rudenko V.V., Tanas A.S., Strelnikov V.V. *Novyye markery anomalnogo metilirovaniya DNK pri rake molochnoy zhelezy. Identifikatsiya metodom nepredvzyatogo skringinga differentsialnogo metilirovaniya genomov*. [New Markers of Abnormal DNA Methylation in Breast Cancer. Identification by an Impartial Screening of Differential Methylation of Genomes]. Laplambert Academ. Publish. 2012; 153: ISBN: 978-3-659-25699-8.
 8. Kekeeva T.V., Nemtsova M.V., Andreeva Y.Y., Frank G.A., Rusakov I.G., Zaletaev D.V. Molecular genetic alterations in prostate cancer microenvironment. In: Handbook of prostate cancer cell research. A.T. Meridith (ed.). Nova Science Publishers, Inc., NY, United States of America. 2009. P. 411–430. ISBN: 978-1-60741-954-9.
 9. Kekeeva T.V., Pal'tseva E.M., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika opredeleniya poteri heterozigotnosti I mikrosatelitnoy nestabilnosti khromosomnykh rayonov 13q14 I 16q23 u patsientov s podozreniyem na rak predstatelnoy zhelezy. Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya*. [Molecular Genetic Standard Technique for Determining the Loss of Heterozygosity and Microsatellite Instability in the 13q14 and 16q23 Chromosomal Regions in Patients with Suspected Prostate Cancer. New Medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2008/151 dated July 23, 2008]. Moscow, 2008.
 10. Kekeeva T.V., Pal'tseva E.M., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika opredeleniya markera TMPRSS2/ERG4 dlya diagnostiki I provedeniya effektivnoy gormonalnoy terapii u patsientov s rakom predstatelnoy zhelezy. Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya*. [Molecular Genetic Standard Technique for Determining the Marker TMPRSS2/ERG4 for Diagnosis and Management of the Effective Hormone Therapy in Patients with Prostate Cancer. New medical DNA technology. Federal Service permit No. 2008/153 dated July 23, 2008]. Moscow, 2008.
 11. Kekeeva T.V., Nemtsova M.V., Shegai P.V., Zaletaev D.V. *Sposob ranney DNK-diagnostiki raka predstatelnoy zhelezy*. [Early DNA Diagnostic Technique of Prostate Cancer. Invention patent No. 2405837 dated December 10, 2010]. Moscow, 2010.
 12. Kekeeva T.V., Zhevlova A.I., Podistov Yu.I., Solov'eva Yu.V., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular Biology*. 2006; 39(2): 224–230.
 13. Kekeeva T.V., Pal'tseva E.M., Strelnikov V.V., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika dlya viyavleniya sredi patsientov s zabolevaniyami sheyki matki bolnykh s predrakovymi (tyazhelaya displaziya vtoroy I tretoy stepeni) I onkologicheskimi izmeneniyami. Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya*. [Molecular Genetic Standard Technique for Determining among Patients with Uterine Cervix Diseases those who Suffers from Premalignant (Heavy Second- and Third-degree Dysplasia) and Onkological Alterations. New medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2008/154 dated July 23, 2008]. Moscow, 2008.
 14. Sidorova I.S., Unanyan A.L., Evtina I.P., Zaletaev D.V. *Sposob prognozirovaniya raka sheyki matki pri dobrokachestvennykh I predrakovykh protsessakh sheyki matki u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta*. [Method of the uterine cervix cancer prognosis in benign and premalignant processes of uterine cervix in women of childbearing potential]. Moscow. Invention patent No. 2466392 dated November 10, 2012.
 15. Sidorova I.S., Unanyan A.L., Vlasov R.S., Zaletaev D.V., Voznesenskii V.I. *Sposob prognozirovaniya razvitiya raka tela matki pri patologicheskikh protsessakh endometriya u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta*. [Method of the Endometrial Carcinogenesis Prognosis in Endometrial Pathological Processes in Women of Childbearing Potential. Invention patent No. 2466390 dated November 10, 2012]. Moscow, 2012.
 16. Mikhailenko D.S. *Molekulyarno-geneticheskaya diagnostika v onkourologii*. [Molecular Genetic Diagnostics in Oncology]. LAP Lambert Academ. Publish. 2013; 72: ISBN: 978-3-659-36373-3.
 17. Mikhailenko D.S., Pal'tseva E.M., Strelnikov V.V., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika otsenki rogressii pervichnoy opukholi pri svetloketochnom rake pochki. Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya*. [Molecular Genetic Standard Technique for Evaluation of the Primary Tumor Proliferation at the Clear Cell Carcinoma of Kidney. New Medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2008/150 dated July 22, 2008]. Moscow, 2008.
 18. Mikhailenko D.S., Pal'tseva E.M., Strelnikov V.V., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika optimizatsii targetnoy terapii pri svetloketochnom rake pochki. Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya*. [Molecular Genetic Standard Technique for the Targeted Therapy Optimization at the Clear Cell Carcinoma of Kidney. New Medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2008/152 dated July 23, 2008]. Moscow, 2008.
 19. Babayan A.Yu., Karyakin O.B., Teplov A.A., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular Biology*. 2011; 45(6): 1012–1016.
 20. Babayan A.Yu., Pal'tseva E.M., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika otsenki riska neblagopriyatnogo techeniya zabolevaniya u bolnykh poverkhnostnym rakom mochevogo puzrya. Novaya meditsinskaya DNK-tehnologiya*. [Molecular Genetic Standard Technique for Evaluation of the Risk of Unfavourable Disease Course in Patients with Superficial Bladder Cancer. New Medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2009/311 dated September 04, 2009]. Moscow, 2009.
 21. Strelnikov V.V., Zemlyakova V.V., Shubina M.V. *Molekulyarno-geneticheskaya diagnostika opukholey golovnogo mozga. V kn.: Vvedenie v molekulyarnuyu diagnostiku. T. 2. Molekulyarno-geneticheskie metody v diagnostike nasledstvennykh i onkologicheskikh zabolevanii. Pod red. M.A. Pal'tseva i D.V. Zaletaeva* [Molecular Genetic Diagnostics of the Brain Tumors. In the book Introduction to Molecular Diagnostics. V. 2. Molecular Genetic Standard Techniques in Diagnostics of Hereditary and Oncological Diseases. Edited by Pal'tsev M.A. and Zaletaev D.V.]. Moscow, Meditsina, 2011. pp. 486–503.
 22. Zemlyakova V.V., Strelnikov V.V., Pal'tseva E.M., Kuznetsova E.B., Smolin A.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-genet-*

- icheskaya metodika opredeleniya geneticheskogo statusa O6-metilguanin-DNK-metiltransferazy u patsiyentov so zlo-kachestvennymi opukholyami golovnogo mozga dlya optimizatsii terapii temozolomidom. Novaya meditsinskaya DNK-tekhnologiya.* [Molecular Genetic Standard Technique for Determining the Genetic Status of O6-methylguanine-DNA-methyl Transferase in Patients with Malignant Brain Tumors for the Temozolomide Therapy Optimization. New Medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2009/316 dated September 04, 2009]. Moscow, 2009.
23. Strel'nikov V.V., Pal'tseva E.M., Kuznetsova E.B., Smolin A.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarno-geneticheskaya metodika opredeleniya poteri geterozigotnosti khromosomnykh rayonov 1p i 19q u patsiyentov s anaplasticheskoy oligodendrogliomoy. Novaya meditsinskaya DNK-tekhnologiya.* [Molecular Genetic Standard Technique for Determining the Loss of Heterozygosity in the 1p and 19q Chromosomal Regions in Patients with Anaplastic Oligodendroglioma. New Medical DNA Technology. Federal Service permit No. 2009/332 dated October 5, 2009]. Moscow, 2009.
24. Babenko O.V., Saakyan S.V., Brovkina A.F., Kozlova V.M., Nemtsova M.V., Zaletaev D.V. *Molekulyarnaya meditsina – Molecular medicine.* 2003; 2: 48–54.
25. Zaletaev D.V., Brovkina A.F., Babenko O.V., Saakyan S.V., Nemtsova M.V. *Provedeniye molekulyarnoy diagnostiki pri retinoblastome.* [Molecular diagnostication for retinoblastoma. Guide for physicians]. Moscow, Ministry of Health of the Russian Federation, 2003.

FOR CORRESPONDANCE

Zaletaev Dmitrii Vladimirovich, PhD, professor, Head of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of RAMS, Head of the laboratory of human molecular genetics of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Address: 1, Moskvorechye St., Moscow, 115478, **tel.:** (985) 991-64-46, **e-mail:** zalnem@mail.ru

Strel'nikov Vladimir Viktorovich, PhD, assistant professor, leading scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** vstrel@list.ru

Nemtsova Marina Vyacheslavovna, PhD, professor, leading scientist of the laboratory of human molecular genetics of the State-funded Educational Institution of Higher Professional Education «I.M. Sechenov First Moscow State Medical University»

Address: Trubetskaya St., 8, build. 2, Moscow, 119991, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** nemtsova_m_v@mail.ru

Babenko Ol'ga Vladimirovna, MD, leading scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** polyakk@list.ru

Kuznetsova Ekaterina Borisovna, MD, senior scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS, leading scientist of the laboratory of human molecular genetics of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** kuznetsova.k@bk.ru

Zemlyakova Valeriya Vladimirovna, MD, senior scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS, senior scientist of the laboratory of human molecular genetics of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, The Ministry of Health of the Russian Federation

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** valzem@inbox.ru

Kekeeva Tat'yana Vladimirovna, MD, research scientist of the laboratory of human molecular genetics of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, The Ministry of Health of the Russian Federation

Address: Trubetskaya St., 8, build. 2, Moscow, 119991, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** kekeeva@mail.ru

Mikhailenko Dmitrii Sergeevich, MD, senior scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** dimserg@mail.ru

Tanas Aleksandr Sergeevich, MD, research scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** tanas80@gmail.com

Rudenko Viktoriya Vladimirovna, PhD in biological sciences, research scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** shkarupo@mail.ru

Babayan Anna Yur'evna, research scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** babayan-a@inbox.ru

Alekseeva Ekaterina Aleksandrovna, research scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** katrina_5@inbox.ru

Simonova Ol'ga Anatol'evna, research scientist of the epigenetics laboratory of the Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Center of Medical Genetics» of the RAMS

Address: Moskvorechye St., 1, Moscow, 115478, **tel.:** (495) 622-96-35, **e-mail:** simonova_o.a@mail.ru