

УДК 616-078:577.2
©Коллектив авторов

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ РНК-ОНКОМАРКЕРОВ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.Г. Глоба^{1}, Я.И. Алексеев¹, Д.А. Варламов¹, А.А. Вишневский²*

¹ГНУ "ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии Россельхозакадемии";
ЗАО "Синтол", ул. Тимирязевская, 42, Москва; эл. почта: aggloba@mail.ru

²ФГУ "Институт хирургии им. А.В. Вишневского Росмедтехнологий",
ул. Большая Серпуховская, 27, Москва

Исследовали уровни РНК-онкомаркёров теломеразы (hTERT), цитокератина-19 (СК-19) и маммаглобина (МАМ) в капиллярной крови пациенток с протоковой карциномой молочной железы. Обнаружили, что все три фактора у большинства пациенток сверхэкспрессированы. Подобная сверхэкспрессия отсутствует у доноров и у пациенток с фиброаденомой молочной железы. После резекции опухолей уровень РНК-онкомаркёров в течение 10 суток нормализуется при условии отсутствия минимальной остаточной болезни. На основании результатов исследования созданы диагностические наборы, которые могут быть использованы для дифференциальной диагностики, скрининга и послеоперационного мониторинга пациенток со злокачественными образованиями молочной железы.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, теломераза, маммаглобин, онкомаркёры, карцинома.

ВВЕДЕНИЕ. Ранее нами сообщалось о том, что определение уровня РНК-онкомаркёров в крови пациентов может быть использовано для диагностики злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта [1]. Дальнейшее развитие этих исследований привело нас к созданию тест-систем и онкопанелей, адаптированных к конкретным клинико-диагностическим задачам. Целью данного исследования являлась разработка подобной онкопанели для ранней диагностики рака молочной железы. Для исследования нами были выбраны следующие РНК-онкомаркёры:

1. Теломераза (hTERT), которая присутствует только в клетках, способных к неограниченному делению, в том числе и раковых; в литературе есть данные о сверхэкспрессии этого фермента в клетках карциномы молочной железы [2].

2. Цитокератин-19 (СК-19), сверхэкспрессия которого обнаружена в тканях опухоли и в лимфоузлах при раке молочной железы и немелкоклеточном раке лёгких [3, 4].

3. Маммаглобин (МАМ), который с высокой специфичностью экспрессируется в тканях опухоли молочной железы [4, 5, 6].

В нашей работе определение этих РНК-онкомаркеров проведено в капиллярной крови пациентов, давших информированное согласие на участие в данном исследовании.

* - адресат для переписки

МЕТОДИКА.

Реактивы для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР реального времени были изготовлены фирмой "СИНТОЛ" (Россия).

Клинический материал. Было обследовано 32 пациентки с протоковой карциномой молочной железы и 3 пациентки с фиброаденомой молочной железы. Группу сравнения составили 27 практически здоровых доноров обоих полов.

Объектом исследования служила капиллярная кровь пациентов, взятая из пальца.

Определение РНК — онкомаркёров включало 3 этапа:

1. Выделение суммарного пула РНК из капиллярной крови пациентов с использованием Tigeagent LS фирмы "Sigma" (США), которое проводили согласно протоколу производителя. В качестве образца брали по 250 мкл капиллярной крови из пальца.

2. Обратная транскрипция осуществлялась с применением вырожденных гексануклеотидных праймеров, как описано ранее [1].

3. Полимеразную цепную реакцию с детекцией продуктов в режиме реального времени (РТ-ПЦР) проводили, используя состав реакционной смеси и условия реакции, приведенные в нашем предыдущем сообщении [1]. Были использованы флуоресцентные зонды вместе со специфическими праймерами. В качестве калибраторов применялись искусственно полученные амплифицируемые участки ДНК. Результаты нормировали по экспрессии референсного гена β -актина и представляли в виде соотношения числа копий данного фактора и β -актина (в условных единицах). В данном исследовании гибридизационная проба и праймеры β -актина были введены в реакционную смесь так, чтобы экспрессия β -актина определялась одновременно с экспрессией исследуемого фактора.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. У 28 пациенток из 32 с протоковой карциномой молочной железы отмечена сверхэкспрессия РНК-онкомаркёра hTERT, составившая в среднем 0,34 ед. У 26 пациенток этой же группы также отмечена сверхэкспрессия СК-19 (0,63 ед.) и МАМ (1,04 ед.). У пациенток с фиброаденомой молочной железы уровень всех трёх РНК-онкомаркёров находился в пределах диапазона референсных значений, установленных нами для доноров. Этот диапазон составил: для hTERT, СК-19 и МАМ — от 0 до 0,1 ед. (табл. 1).

Таблица 1. Уровень исследованных РНК-онкомаркёров в крови пациенток с протоковой карциномой молочной железы и доноров.

Объект исследования	n	hTERT	СК-19	маммаглобин
Рак молочной железы (протоковая карцинома)	32	0,34±0,04* n=28 (88%)*	0,63±0,08 n=26 (81%)	1,04±0,16 n=26 (81%)
Доноры	27	0,05±0,003	0,003±0,0004	0,002±0,0003

Примечание: * - результаты представлены в виде соотношения числа копий исследуемого фактора и β -актина (в условных единицах); ** - указано количество пациенток, в крови которых обнаружился повышенный уровень исследуемого РНК-онкомаркёра.

Предложенный нами диагностический метод оказался применим и для послеоперационного обследования пациенток на предмет полноты удаления опухоли. Из 32 пациенток с РМЖ 8 было обследовано через 10 суток после операции. У всех уровень РНК-онкомаркёров снижался до референсных значений (табл. 2).

Таблица 2. Уровень исследованных РНК-онкомаркёров в крови пациенток с протоковой карциномой молочной железы в до- и послеоперационный период.

Объект исследования	n	hTERT		СК-19		маммаглобин	
		до операции	10 сут.п.о	до операции	10 сут.п.о	до операции	10 сут.п.о
Рак молочной железы (протоковая карцинома)	8	0,28±0,03	0,05±0,007	1,72±0,08	0,04±0,003	2,05±0,18	0,03±0,004
Норма (доноры)	27	0-0,1		0-0,1		0-0,1	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Следует отметить, что онкобелки, в синтезе которых принимают участие выбранные нами мРНК, иммуноферментными методами не определяются. Исключение составляет структурный белок СК-19, фрагмент которого под названием CYFRA21-1 определяется в плазме крови методом ИФА. Его повышенная концентрация свидетельствует о немелкоклеточной и плоскоклеточной карциномах лёгких и о карциноме мочевого пузыря. Имеются также сведения о сверхэкспрессии СК-19 в крови при немелкоклеточном раке лёгких [7]. В исследованиях, проведённых нами, уровень РНК-онкомаркёра СК-19 в крови был повышен в среднем до 0,54 ед. у 12 пациентов с мелкоклеточным раком лёгких. Это согласуется с данными вышеприведённых авторов, но не снижает ценности СК-19 для диагностики злокачественных образований молочной железы. В диагностике рака молочной железы наиболее специфичным оказался РНК-онкомаркёр маммаглобин (МАМ). Исследование уровня его экспрессии в крови пациентов со злокачественными образованиями желудочно-кишечного тракта и лёгких дало отрицательные результаты (данные не приведены). Анализируя работы других исследовательских групп можно заключить, что метод РТ-ПЦР наиболее перспективен для обнаружения этого фактора в периферической крови. Такие методы, как ИФА [8] и Nested-PCR [9] оказались пригодными для определения диагностических показателей только в биоптатах, а не в периферической крови. Результатом наших исследований стало создание диагностических наборов, которые могут быть использованы для обследования пациенток с подозрением на злокачественные образования молочной железы.

ВЫВОДЫ:

1. Уровни РНК – онкомаркёров hTERT, СК-19 и МАМ у пациенток с раком молочной железы (РМЖ) значительно выше, чем у доноров.
2. Сверхэкспрессия РНК-маркёра СК-19 обнаруживается как при РМЖ, так и при мелкоклеточном раке лёгких. Этот факт необходимо учитывать при использовании теста для скрининга и первичной диагностики.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 гг.” ГЛ №16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП “ВНИИСБ”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глоба А.Г., Вишневский В.А., Демидова В.С., Дикова О.Н., Щёголев А.И. (2010) Биомед. химия, **56**(4), 510-515.
2. Hosseini-Asl S., Atri M., Modarressi M.H., Salhab M., Mokbel K., Mehdipour P. (2006) Int. Semin. Surg. Oncol., **3**, 20.
3. Daskalaki A., Agelaki S., Perraki M., Apostolaki S., Xenidis N., Stathopoulos E., Kontopodis E., Hatzidaki D., Mavroudis D., Georgoulas V. (2009) Cancer, **101**(4), 589-597.
4. Ignatiadis M., Kallergi G., Ntoulia M., Perraki M., Apostolaki S., Kafousi M., Chlouverakis G., Stathopoulos E., Lianidou E., Georgoulas V., Mavroudis D. (2008) Clin. Cancer Res., **14**(9), 2593-2600.
5. Colpitts T.L., Billing-Medel P., Friedman P. et al. (2001) Biochemistry, **40**, 11048-11059.
6. Ouellette R.J., Richard D., Maicas E. (2004) Am. J. Clin. Pathol., **121**, 637-643.
7. Qu Y.M., Liao G.Q., Liu P.H., Wang H.M., Liu L., Li L.L., Xie G.Q. (2010) Zhonghua Yi Xue Za Zhi **90**(28), 1958-1962.
8. Bernstein J.L., Godbold J.H., Raptis G., Watson M.A., Levinson B., Aaronson S.A., Fleming T.P. (2005) Clin. Cancer Res., **11**(18), 6528-6535.
9. Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Чазова Н.Л., Мельникова Н.В., Кудинова Е.А., Джикия Е.Л., Буйнова Д.С. (2009) Вестник РНЦРР **9**. Доступно по URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v9/papers/bozhenko_v9.htm

Поступила: 07. 09. 2011.

THE DIAGNOSTIC VALUE OF RNA ONCOMARKERS IN EVALUATION OF MALIGNANT BREAST TUMORS

A.G. Globa¹, Y.I. Alekseev¹, D.A. Varlamov¹, A.A. Vishnevsky²

¹Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Agricultural Sciences, ZAO Sintol, Timiryazevskaya ul., 42, Moscow, 127550 Russia; e-mail: aggloba@mail.ru

²Vishnevsky Institute of Surgery, ul. Bolshaya Serpukhovskaya, 27, Moscow, Russia

The levels of the RNA oncomarkers, telomerase (hTERT), cytokeratin-19 (CK-19) and mammaglobin (MAM) have been investigated in capillary blood of female patients with mammary ductal carcinoma. The study revealed overexpression of all three factors in patients with this pathology. This overexpression was not found in healthy donors and female patients with mammary fibroadenoma. Levels of the RNA oncomarkers return to the normal level within 10 days after successful tumor resection. These results have been used for the development of diagnostic kits, which may be applicable for differential diagnostics, screening and postoperation monitoring of patients with malignant breast tumors

Key words: polymerase chain reaction, telomerase, mammaglobin, oncomarkers, carcinoma.