Биомедицинская химия, 2008 том 54, вып. 1, с. 94-103.

УДК 577.123.8+616-064

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ДНК И РНК КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.Ю. Рыкова[1]*, Т.Э. Скворцова[1], А.-Л. Хоффман[2], С.Н. Тамкович[1,3], А.В. Стариков[4], О.Е. Брызгунова[1], В.И. Пермякова[5], Е. Варнеке[2], Г. Шакиель[2], В.В. Власов[1], П.П. Лактионов[1]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8; тел.: (383)330-46-54, факс: (383)333-36-77; эл. почта: rykova@niboch.nsc.ru
[2]Институт молекулярной медицины университета Любека, Любек, Германия
[3]Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2
[4]ГУЗ Новосибирский областной онкологический диспансер, 630108, Новосибирск, ул. Плахотного, 2
[5]Центральная клиническая больница СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 25

Циркулирующие внеклеточные РНК и ДНК были выделены из плазмы крови и из элюатов с поверхности форменных элементов крови здоровых женщин, больных фиброаденомой и раком молочной железы. Методом метил-специфичной ПЦР показано, что в ДНК плазмы крови метилированная форма хотя бы одного из трех генов опухолевой супрессии RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 встречается у 13% больных фиброаденомой и 60% больных раком молочной железы. При использовании суммарной циркулирующей ДНК частота встречаемости метилированных маркеров повышается до 95% при раке и до 87% при фиброаденоме молочной железы. У клинически здоровых женщин метилированные маркеры в составе внеклеточной ДНК не выявляются.

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени определяли количество копий 18S рРНК, мРНК GAPDH, мРНК RASSF8, мРНК Ki-67 во внеклеточной РНК, циркулирующей в крови. Показано, что большая часть специфических РНК связана с поверхностью клеток крови. Методом ROC-анализа показано, что различия концентраций 18S рРНК, мРНК RASSF8 и мРНК Ki-67 в РНК плазмы крови позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью дифференцировать злокачественные и доброкачественные опухоли молочной железы.

Таким образом, анализ, основанный на определении метилированных форм генов опухолевой супрессии в циркулирующей ДНК крови, и количественный анализ циркулирующих в плазме крови специфических РНК позволяет выявлять опухоли молочной железы и дифференцировать злокачественные и доброкачественные новообразования.

Ключевые слова: циркулирующая внеклеточная ДНК, циркулирующая внеклеточная РНК, метил-специфичная ПЦР, ОТ-ПЦР, опухоль молочной железы.

ВВЕДЕНИЕ. Свободные нуклеиновые кислоты обнаруживаются в плазме крови у здоровых людей; при некоторых заболеваниях (аутоиммунные патологии, диабет, травмы, опухоли) содержание ДНК в плазме заметно возрастает [1, 2].

* - адресат для переписки

Внеклеточные ДНК (внДНК) в плазме крови раковых больных обладают генетическими характеристиками, идентичными ДНК опухоли [3]. В связи с этим большой интерес вызывает использование циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот из плазмы крови для разработки неинвазивного теста диагностики и мониторинга течения онкологических заболеваний [4].

Анализ профиля метилирования регуляторных областей генов является перспективным подходом для выявления онкотрансформации клеток [5]. Метил-специфичная ПЦР циркулирующей ДНК может стать одним из эффективных методов малоинвазивного выявления рака на ранней стадии [6]. Однако, частота выявления аберрантно метилированных маркеров в плазме от больных раком существенно ниже по сравнению с образцами опухолевой ткани [3]. В предварительных экспериментах нами показано, что в составе внДНК, связанных с поверхностью клеток крови, как и в ДНК плазмы, обнаруживаются онкоспецифические последовательности ДНК [7].

Активация пролиферации трансформированных клеток сопровождается увеличением экспрессии определенных генов. Несмотря на высокую рибонуклеазную активность плазмы крови при развитии опухолей [8], методом ОТ-ПЦР в ней были обнаружены внеклеточные РНК (внРНК) [1, 9]. Для оценки количества циркулирующей в плазме крови РНК в норме и при онкопатологиях была успешно использована ОТ-ПЦР генов “домашнего хозяйства” [8, 10]. Однако до сих пор нет ответа на вопрос о том, какие именно гены следует использовать для оценки концентраций и распределения внРНК в крови. Вопрос о закономерностях распределения внРНК в крови в норме и при развитии опухолей остается практически неизученным. При раке молочной железы в плазме крови удалось амплифицировать мРНК некоторых генов, гиперэкспрессированных в тканях опухолей, например, мРНК маммаглобина, мРНК тирозиназы, мРНК цитокератина 19 [9]. Согласно исследованию [11], метод выявления рака молочной железы на основе циркулирующих в плазме крови специфических мРНК характеризуется большей чувствительностью, чем методы на основе циркулирующей ДНК.

В данной работе методом метил-специфической ПЦР была исследована частота встречаемости метилированных форм трех генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 в ДНК плазмы и ДНК, связанной с поверхностью форменных элементов крови при опухолях молочной железы. Был проведен сравнительный анализ концентраций и распределения в крови количества копий 18S рРНК, мРНК GAPDH и мРНК генов RASSF8, Ki-67 у клинически здоровых женщин и больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы.

МЕТОДИКА. *Обработка крови и выделение внеклеточных нуклеиновых кислот.* Образцы крови здоровых женщин (n = 20) были получены из Центральной клинической больницы СО РАН. Образцы крови больных с фиброаденомой (n = 15) и раком молочной железы (n = 20), не получавших предварительного лечения, были получены из Новосибирского онкологического диспансера. Стадию заболевания определяли по TNM-классификации. Образцы крови хранили при 4°C и обрабатывали в ближайшие 6 часов после забора крови путем венопункции.

Образцы крови разделяли на плазму и фракцию клеток крови центрифугированием. Элюаты с поверхности клеток крови получали последовательной обработкой клеток 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,5, 0,15 M NaCl, содержащим 5 мМ ЭДТА (ФБ-ЭДТА фракция) и 0,25 % раствором трипсина (трипсиновая фракция), как описано ранее [12].

Определение метилированых форм генов во внеклеточной ДНК. ДНК выделяли из 1 мл плазмы, 6 мл ФБ-ЭДТА и 1 мл трипсиновой фракции методом сорбции на мелкодисперсном активированном стекле, как описано ранее [13]. Метилирование промоторов генов опухолевой супрессии RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 определяли при помощи метода метил-специфичной ПЦР [14]. Образцы ДНК модифицировали бисульфитом натрия, очищали с использованием мелкодисперсного активированного стекла, элюировали в объеме 150 мкл и хранили в аликвотах при –20°C. ПЦР проводили с использованием праймеров, приведенных в таблице 1. Продукты ПЦР визуализировали при помощи электрофореза в ПААГ с последующим окрашиванием бромистым этидием.

Таблица 1. Последовательности праймеров для метил-специфичной ПЦР.

Ген	Праймеры 5'- 3'	Длина, п.о.	t^0 (C)
RASSF1A	Mf: GGG TTT TGC GAG AGC GCG Mr: GCT AAC AAA CGC GAA CCG Uf: GGT TTT GTG AGA GTG TGT TTAG Ur: CAC TAA CAA ACA CAA ACC AAC	169 169	64 59
RARβ2	Mf: TAG TAG TTC GGG TAG GGT TTA TC Mr: CCG AAT CCT ACC CCG ACG Uf: TTA GTA GTT TGG GTA GGG TTT ATT Ur: CCA AAT CCT ACC CCA ACA	235 233	64 55
Cyclin D2	Mf: GGC GGA TTT TAT CGT AGT CG Mr: CTC CAC GCT CGA TCC TTC G Uf: AGA GTA TGT GTT AGG GTT GAT T Ur: ACA TCC TCA CCA ACC CTC CA	101 106	59 56

Примечание: Mf, Mr-праймеры, специфичные к метилированной форме гена, Uf, Ur - праймеры, специфичные к неметилированной форме гена,

Определение количества копий специфических РНК. Выделение внРНК из фракций крови проводили на стекловолокнистых фильтрах [15]. Образцы выделенной РНК обрабатывали инкубированием с ДНКазой, не содержащей РНКаз (2 ед. активности, Fermentas, EN0531) в течение 1 часа при 37°C.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием гексамерных праймеров случайной последовательности и набора SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, США) как описано в работе [16]. ОТ-ПЦР проводили по технологии Taqman с использованием набора для детекции 18S rRNA Control kit Yakima Yellow®- Eclipse® D15ark Quencher (Eurogentec, Бельгия). Праймеры и Taqman пробы для мРНК GAPDH, RASSF8 и Ki-67 были разработаны и синтезированы как описано в работе [17]. Статистический анализ результатов проводили при помощи программ Statistica 6.0 и MedCalc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Метилирование генов опухолевой супрессии RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 в циркулирующей ДНК.* Эпигенетические изменения генов опухолевой супрессии и протоонкогенов являются одним из пусковых механизмов злокачественной трансформации клеток. Метилированные формы генов опухолевой супрессии теоретически являются ранними онкомаркерами, что особенно важно при разработке ранних неинвазивных методов диагностики онкологических заболеваний. Согласно литературным данным, аберрантное метилирование генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 встречается с высокой частотой в тканях злокачественных опухолей молочной железы [18]. Ранее показано, что при раке молочной железы, как и при других опухолях, в плазме крови концентрация внеклеточной ДНК повышается и выявляются внеклеточные ДНК, имеющие опухолевое происхождение [1-4, 9, 14].

В данной работе мы определяли методом метил-специфичной ПЦР аберрантное метилирование промоторных областей трех генов RARβ2, RASSF1A и Cyclin D2 в различных фракциях внеклеточной ДНК из крови здоровых доноров и больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы. ДНК выделяли из плазмы крови и элюатов с клеточной поверхности, полученных в результате последовательной обработки клеток ФБ-ЭДТА и раствором трипсина. На рисунке представлены результаты ПЦР-анализа метилированных и неметилированных форм трех генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 во внеклеточной циркулирующей ДНК у пациентки со злокачественной опухолью молочной железы. Во всех фракциях внДНК присутствуют продукты реакции, специфичной к неметилированным формам генов, источником которых являются клетки нормальных тканей. В некоторых из фракций выявляется продукт ПЦР, специфичный к гиперметилированной форме, имеющей опухолевое происхождение (рисунок).

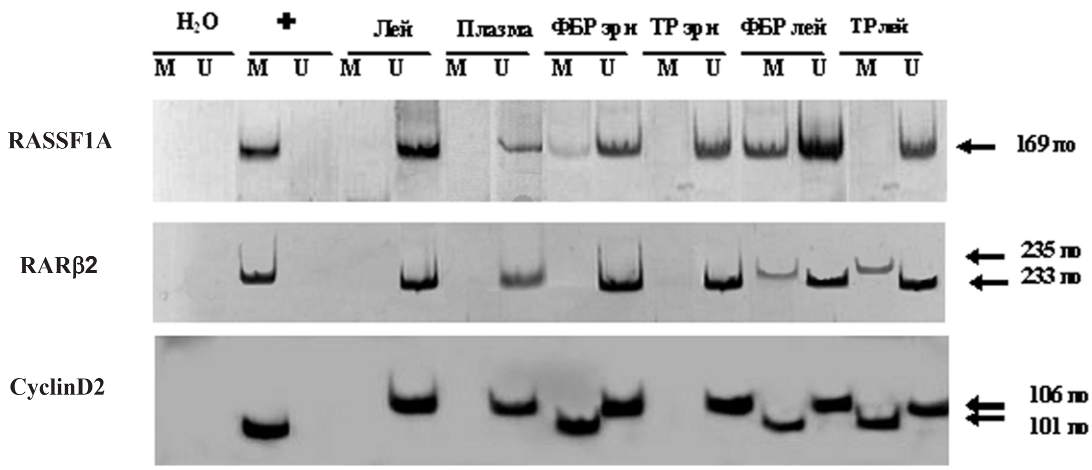

Рисунок.
Результаты метил-специфичного ПЦР-анализа генов RASSF1A, RARβ2 и Cyclin D2 во внеклеточной ДНК крови при раке молочной железы. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов метилированной (М) и неметилированной (U) форм генов. В качестве матрицы использовали внеклеточную ДНК, выделенную из плазмы крови, из фракций ДНК, элюированных с поверхности эритроцитов (эри) и лейкоцитов (лей) при помощи фосфатного буфера (ФБ) и раствора трипсина (ТР). Для контроля на метилированные формы генов использовали ДНК клеток А431, Hela и KB (+), на неметилированные формы – ДНК лейкоцитов здоровых людей (лей).

Полученные данные о частоте встречаемости одного из двух или трех исследованных генов при их выявлении в одних и тех же образцах крови представлены в таблице 2. Согласно полученным результатам, гиперметилирование промоторных областей хотя бы одного из трех генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 в пуле внеклеточных ДНК плазмы было выявлено у 60% больных раком молочной железы и 13% пациентов с фиброаденомой (табл. 2). Использование всей циркулирующей в крови внеклеточной ДНК для анализа метилирования трёх генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 приводит к увеличению частоты их выявления до 95% при злокачественных опухолях молочной железы и 87% при доброкачественных опухолях молочной железы. Полученные данные свидетельствуют о том, что суммарная внДНК крови является более информативным и надежным источником материала для ПЦР-анализа метилирования генов опухолевой супрессии по сравнению с циркулирующей ДНК плазмы. Следует отметить, что метилированные формы всех трех генов не обнаружены у здоровых женщин в циркулирующей ДНК как в плазме, так и на поверхности клеток, что обеспечивает высокую специфичность метода.

Таблица 2. Частота встречаемости (%) аберрантно метилированных форм генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 во внеклеточной ДНК крови в норме и при опухолях молочной железы.

Диагноз / Гены	Рак молочной железы (n=20)		Фиброаденома молочной железы (n=15)		Норма (n=10)	
	внДНК плазмы	Суммарная внДНК крови	внДНК плазмы	Суммарная внДНК крови	внДНК плазмы	Суммарная внДНК крови
RASSF1A или RARβ или Cyclin D2	60	95	13	87	0	0
RASSF1A или RARβ	30	90	13	60	0	0
RASSF1A или Cyclin D2	50	95	6	80	0	0
RARβ или Cyclin D2	50	85	13	60	0	0

Остаётся неизвестным, коррелирует ли гиперметилирование промоторных областей генов опухолевой супрессии при доброкачественных новообразованиях с возможностью злокачественного перерождения опухолей, хотя количественный анализ уровня метилирования генов у онкологических больных выявляет разницу в количестве метилированных аллелей [19]. Для специфичной диагностики опухолей необходим дальнейший поиск генов, избирательно метилированных при раке и разработка количественных методов анализа, позволяющих отличать злокачественные и доброкачественные новообразования по уровню метилирования генов во внеклеточной ДНК крови.

Концентрации циркулирующих специфических РНК. Целью работы было исследование диагностической значимости количественного анализа внеклеточных РНК в крови для дифференциальной диагностики опухолей молочной железы. Для этого мы провели сравнительный анализ концентраций и распределения в крови здоровых женщин и больных опухолями молочной железы РНК "генов домашнего хозяйства" GAPDH и 18S, а также мРНК генов, гиперэкспрессированных в опухолях молочной железы. Одним из потенциальных кандидатов на роль онкомаркера при раке молочной железы является мРНК гена RASSF8, который гиперэкспрессирован в культивируемых клетках опухоли молочной железы MCF-7 [20]. Другим перспективным кандидатом может служить мРНК гена Ki-67, который является давно известным маркером опухолевого роста и характеризует активную пролиферацию клеток [21].

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени было измерено количество копий 18S рРНК, мРНК генов GAPDH, RASSF8 и Ki-67 в РНК плазмы крови и во фракциях РНК, связанных с клеточной поверхностью, полученных обработкой клеток ФБ-ЭДТА и трипсином. Оказалось, что 63-75% копий 18S рРНК и 70-86% копий мРНК генов GAPDH, RASSF8 и Ki-67 находится во фракции РНК, связанной с клеточной поверхностью как у здоровых женщин, так и у больных с доброкачественными и злокачественными патологиями молочной железы (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение исследованных циркулирующих внРНК в крови между плазмой и фракцией, связанной с клеточной поверхностью, достоверно не изменяется при развитии опухолей молочной железы по сравнению с нормой. Большая часть внРНК остается связанной с поверхностью форменных элементов крови, в отличие от внДНК, концентрация которой достоверно увеличивается в плазме и снижается во фракции внДНК, связанных с поверхностью клеток крови у больных раком молочной железы [14].

Таблица 3. Данные о распределении внРНК между свободно циркулирующей и связанной с поверхностью клеток крови.

	GAPDH	**18S рРНК**	**Ki-67**	**RASSF8**
Клинически здоровые	**79±28***	**75±27**	**82±23**	**73±23**
Больные фиброаденомой молочной железы	**71±24**	**63±36**	**84±20**	**86±39**
Больные раком молочной железы	**75±21**	**64±25**	**76±24**	**70±29**

Примечание: * - % внРНК, связанной с поверхностью клеток крови в общем количестве внРНК (среднее ± стандартное отклонение).

Согласно полученным данным, для мРНК GAPDH в крови характерна высокая вариабельность как в группе здоровых женщин (значения различаются в 170 раз), так и в группе больных раком молочной железы (значения различаются в 2400 раз) (данные не представлены). Эти данные согласуются с результатами других исследований, где показано, что несмотря на широкое использование для нормализации уровня экспрессии других генов как в плазме крови, так и в тканях опухоли, именно мРНК GAPDH имеет вариабельную экспрессию [22]. Уровень мРНК GAPDH зависит от уровня глюкозы в крови и связан с процессами апоптоза и нейродегенеративных заболеваний [22, 23]. При активации поликлональных Т-лимфоцитов уровень экспрессии 18S рРНК оставался неизменным, тогда как уровень экспрессии мРНК GAPDH и β-актина значительно изменялся [24]. Согласно нашим результатам, при анализе внеклеточных РНК в крови методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени 18S рРНК является более стабильным внутренним стандартом, чем мРНК GAPDH.

Мы проанализировали количественные различия РНК между группой больных раком молочной железы и группой клинически здоровых женщин, а также между группами пациенток с доброкачественными и злокачественными опухолями (табл. 4). Методом сравнения двух независимых выборок по критерию Манна-Уитни было показано, что количество копий 18S рРНК и опухолеспецифических мРНК RASSF8 и Ki-67 у пациенток со злокачественными опухолями достоверно возрастает по сравнению с группой клинически здоровых женщин во внеклеточных РНК плазмы и в суммарной внеклеточной РНК крови (табл. 4). Кроме того, анализ различий между группой пациенток, больных фиброаденомой, и группой больных раком молочной железы показал, что уровень РНК генов GAPDH, 18S, RASSF8 и Ki-67 достоверно различается, что свидетельствует о возможности использования количественного анализа этих РНК для дифференцировки злокачественных опухолей. Высокая вариабельность может быть одной из причин недостоверности различий количества мРНК GAPDH как в РНК плазмы, так и в суммарной РНК крови между нормой и злокачественными опухолями молочной железы (табл. 4).

Таблица 4. Результаты анализа достоверности различий по количеству копий внеклеточной РНК между группами здоровых женщин, больных фиброаденомой и раком молочной железы.

Отличия между группами	**GAPDH**	**18S рРНК**	**Ki-67**	**RASSF8**
внРНК в плазме крови здоровые/рак	**Недостоверно 0,155231***	**Достоверно 0,000083**	**Достоверно 0,009225**	**Достоверно 0,018670**
внРНК суммарная здоровые/рак	**Недостоверно 0,096481**	**Достоверно 0,000002**	**Достоверно 0,003940**	**Достоверно 0,047454**
внРНК в плазме крови фиброаденома/рак	**Достоверно 0,001045**	**Достоверно 0,000099**	**Достоверно 0,002174**	**Достоверно 0,000161**
внРНК суммарная фиброаденома/рак	**Достоверно 0,000259**	**Достоверно 0,000074**	**Достоверно 0,000990**	**Достоверно 0.003085**

Примечание: * - приведены результаты сравнения двух независимых выборок по критерию Манна-Уитни (значения p).

Диагностическую значимость количественного определения 18S рРНК, мРНК RASSF8 и Ki-67 в плазме крови оценивали методом ROC-анализа (табл. 5). Сравнивали группы пациенток со злокачественными опухолями молочной железы и группой, включающей клинически здоровых женщин и пациенток с доброкачественными опухолями. При определении порогового уровня детекции для 18S рРНК как $2{,}15\times10^{5}$ копий/мл плазмы чувствительность анализа (количество правильно определенных пациентов со злокачественными опухолями молочной железы) составляет 82%. Анализ характеризуется также высокой специфичностью (92%), поскольку большинство здоровых женщин и пациенток с фиброаденомой не дают ложноположительных результатов. Для опухолеспецифической мРНК Ki-67 чувствительность теста при пороговом уровне $4{,}7\times10^4$ копий/мл составляет 73%, специфичность 80%. Для мРНК RASSF8 чувствительность теста при пороговом уровне $3{,}0\text{x}10^3$ копий/мл составляет 73%, специфичность 74%. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования количественного анализа этих РНК как для разработки малоинвазивного скринингового теста на выявление опухолей молочной железы, так и для дифференциальной диагностики опухолей уже выявленных, например, методом метил-специфичного анализа внДНК крови.

Таблица 5. Чувствительность и специфичность количественного ОТ-ПЦР анализа мРНК RASSF8, Ki-67 и 18S рРНК при сравнении группы больных раком молочной железы с группой здоровых женщин и пациенток с фиброаденомой.

	мРНК гена RASSF8	мРНК гена Ki-67	18S рРНК
Пороговый уровень (копий/мл плазмы)	3000	47000	215000
Чувствительность теста (%) (95%CI)	73 (49,8–89,2)	73 (49,8–89,2)	82 (59,7–94,7)
Специфичность теста (%) (95%CI)	74 (53,7–88,8)	80 (62,1-91,3)	92 (76,3–98,0)
Площадь графика (по данным ROC анализа)	0.74 (0,60–0,85)	0.78 (0,64–0,87)	0.85 (0,72–0,92)

Примечание: Статистический анализ результатов проводили методом ROC- анализа при помощи программы MedCalc.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Показано, что доброкачественные и злокачественные опухоли молочной железы с высокой чувствительностью выявляются методом метил-специфичной ПЦР генов опухолевой супрессии в циркулирующей ДНК крови. Анализ трех генов RASSF1A, Cyclin D2 и RARβ2 методом метил-специфичной ПЦР приводит к выявлению 95% злокачественных опухолей и 87% доброкачественных опухолей молочной железы при использовании для анализа суммарной внДНК крови.

Методом количественной ОТ-ПЦР выявлено достоверное увеличение количества копий 18S рРНК и мРНК генов RASSF8 и Ki-67 в крови больных раком молочной железы относительно группы клинически здоровых женщин и группы пациенток с фиброаденомой. Анализ 18S рРНК в плазме крови характеризуется наиболее высокой чувствительностью (82%) и специфичностью (92%).

Таким образом, количественый ОТ-ПЦР анализ внРНК, циркулирующих в крови, позволяет с высокой специфичностью дифференцировать новообразования, выявленные методом метил-специфичной ПЦР.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (№ 06-04-49732а), грантами Российской академии наук “Фундаментальные науки – медицине”, президента РФ (МК-59.2007.4), BRHE (№ Y4-B-08-13), Рособразования (РНП.2.2.2.3.10035), интеграционным проектом СО РАН №13, Лаврентьевским грантом для молодых ученых СО РАН-2006-2007 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tong Y., Lo Y.M.* (2006) Clin. Chim. Acta, **363**, 187-196.
2. *Swaminathan R., Butt A.N.* (2006) Ann. N. Y. Acad. Sci., **1075**, 1-9.
3. *Anker P., Mulcahy H., Stroun M.* (2003) Int. J. Cancer, **103**, 149-152.
4. *Fiegl H., Millinger S., Mueller-Holzner E., Marth C., Ensinger C., Berger A., Klocker H., Goebel G., Widschwendter M.* (2005) Cancer Res., **65**, 1141-1145.
5. *Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A.* (2004) Nature, **429,** 457-463.
6. *Miyamoto K., Ushijima T.* (2005) Jpn. J. Clin. Oncol., **35**, 293-301.
7. *Rykova E.Y., Laktionov P.P., Skvortsova T.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V.* (2004) Ann. N. Y. Acad. Sci., **1022**, 217-221.
8. *Ng E.K., Tsui N., Lam N., Chiu R., Yu S., Wong S., Lo E., Rainer T., Johnson P., Lo Y.* (2002) Clin. Chem., **48**, 1212-1217.
9. *Fleishhacker M., Schmidt B.* (2007) Biochim. Biophys. Acta, **1775**, 181-232.
10. *Pachot A., Jean-Luc B., Mougin B., Miossec P.* (2004) J. Biotechnol., **114**, 121-124.
11. *Silva J.M., Garcia J.M., Dominguez G., Silva J., Miralles C., Cantos B., Coca S., Provencio M., Espana P., Bonilla F.* (2002) Ann. Surg. Oncol., **9**, 71-76.
12. *Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е., Рыкова Е.Ю., Колесникова Е.В., Шелестюк П.И., Лактионов П.П., Власов В.В.* (2005) Биомед. химия, **51**, 321-328.
13. *Tamkovich S.N., Laktionov P.P., Rykova E.Y., Vlassov V.V.* (2004) Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, **23**, 873-877.
14. *Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P.* (2006) Br. J. Cancer, **94**, 1492-1495.
15. *Лактионов П.П., Тамкович С.Н., Рыкова Е.Ю., Власов В*.В. (2006) Способ выделения нуклеиновых кислот. Патент на изобретение № 2272072. 20 марта 2006 г.
16. *Rykova E.Y., Wunsche W., Brizgunova O.E., Skvortsova T.E., Tamkovich S.N., Senin I.S., Laktionov P.P., Sczakiel G., Vlassov V.V.* (2006) Ann. N. Y. Acad Sci., **1075**, 328-333.
17. *Menke T.B., Boettcher K., Kruger S., Kausch I., Boehle A., Sczakiel G., Warnecke J.M.* (2004) Clin. Chem., **50**, 1461-1463.
18. *Widschwendter M., Jones P.A.* (2002) Oncogene, **21**, 5462-5482.
19. *Lehmann U., Langer F., Feist H., Glockner S., Hasemeier B., Kreipe H.* (2002) Am. J. Pathol., **160**, 605- 612.
20. *Rykova E.Y., Hoffman A.L., Wunsche W., Brizgunova O.E., Skvortsova T.E., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Sczakiel G., Vlassov V.V., Warnecke J., Laktionov P.P.* (2007) Int. J. Cancer, в печати
21. *Schlosen T., Gerdes J.* (2000) J. Cell. Physiol., **182**, 311-322.
22. *Zhang X., Ding L., Sandford A.J.* (2005) BMC Mol. Biol., **6**, 4.
23. *Zhu G., Chang Y., Zuo J., Dong X., Zhang M., Hu G., Fang F.* (2003) Cancer Sci., **93**, 59-72.
24. *Bas A., Forsberg G., Hammarstrom S., Hammarstrom M.L.* (2004) Scand. J. Immunol., **59**, 566-623.

Поступила: 07. 05. 2007.

BREAST CANCER DIAGNOSTICS BASED ON EXTRACELLULAR DNA AND RNA CIRCULATING IN BLOOD

E.Y. Rykova[1], T.E. Skvortsova[1], A.L. Hoffmann[2], S.N. Tamkovich[1,3], A.V. Starikov[4], O.E. Bryzgunova[1], V.I. Permjakova[5], J.M. Warnecke[2], G. Sczakiel[2], V.V. Vlassov[1], P.P. Laktionov[1]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Sibirian Division of the Russian Academy of Sciences, prosp. Lavrentjeva, 8, Novosibirsk, 630090 Russia; tel.: (383)330-46-54; fax: (383)333-36-77; e-mail: rykova@niboch.nsc.ru

[2]Institut fur Molekulare Medizin, UK-SH, Campus Luebeck, Ratzeburger Allee 160,D-23538, Luebeck, Germany

[3]Novosibirsk State University, prosp. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 Russia

[4]National Novosibirsk Regional Oncologic Dispensary, Plahotnogo ul., 2, Novosibirsk, 630108 Russia

[5]Central Clinical Hospital Siberian Division of RAS, prosp. Pirogova, 25, Novosibirsk, 630090 Russia

Extracellular DNA and RNA were extracted from blood plasma and cell surface-bound fractions of patients with breast tumors and healthy controls. Frequency of RASSF1A, Cyclin D2 and RARβ2 methylation was detected using methylation-specific PCR in the extracellular DNA, extracted from plasma and cell-surface bound fractions of patient blood. Methylation of at least one of these genes was found in plasma of 13% patients with benign breast fibroadenoma and in 60% of breast cancer patients. Using cell-surface bound DNA as a substrate for PCR have lead to increase of gene methylation detection frequency up to 87% in fibroadenoma and 95% in breast cancer patients without false positive controls.

GAPDH, RASSF8, Ki-67 RNA and 18S RNA were quantified using RT-qPCR of the extracellular RNA circulating in blood of patients with breast tumors and healthy controls. The main part of the extracellular RNA was shown to be cell-surface bound. Results show a higher amount of RASSF8, Ki-67 RNA and 18S RNA in plasma and cell-bound fraction of patients with breast cancer compared with patients with benign tumors and healthy controls. The data indicate that the specific RNA quantification in blood plasma is valuable for discrimination between cancer and benign tumors, which can be detected with high sensitivity using analysis of methylated RASSF1A, Cyclin D2 and RARβ2 genes in extracellular circulating DNA.

Key words: circulating extracellular DNA, circulating extracellular RNA, methylation-specific PCR, RT-PCR, breast tumor.