

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616-078:577.2  
©Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЕЙ РНК-ОНКОМАРКЕРОВ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОБРАЗОВАНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

*А.Г. Глоба\*, В.С. Демидова, О.Н. Дикова, В.А. Вишневский, А.И. Щёголев*

ФГУ "Институт хирургии им. А.В. Вишневского Росмедтехнологий", Москва,  
Большая Серпуховская, 27; тел.: 236-20-52; эл. почта: aggloba@mail.ru

С целью создания диагностической панели в капиллярной крови пациентов с различными злокачественными опухолями ЖКТ определяли уровни специфических матричных РНК (мРНК) генов-онкомаркёров при помощи метода обратной транскрипции и ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени с помощью зондов TaqMan. Установлено, что использование малых объёмов капиллярной крови не снижает чувствительность метода. Экспрессия РНК теломеразы (mhTERT), альфа-фетопротеина (mAFP), карциноэмбрионального антигена (mCEA) и цитокератина-20 (mCK-20) была повышена у большинства пациентов онкологической группы. В крови доноров и пациентов неонкологической группы исследованные РНК-маркёры также содержались, но в гораздо меньших, следовых количествах. Исследованные РНК-онкомаркёры обладают достаточно высокой специфичностью и чувствительностью для использования их в диагностических целях. Маркёр mhTERT оказался наиболее универсальным и проявил наибольшую специфичность и чувствительность. Комбинированное определение нескольких РНК-онкомаркёров повышало чувствительность метода. Делается вывод, что исследование уровня РНК-онкомаркёров в малых объёмах капиллярной крови может быть использовано для скрининга, первичной диагностики и послеоперационного мониторинга.

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

**ВВЕДЕНИЕ.** Метод, основанный на обнаружении РНК-маркеров в крови, является перспективным направлением в диагностике онкологических заболеваний. Поиск таких маркеров проводится научными группами во всём мире. Для многих типов опухолей при использовании культур трансформированных клеток такие специфические маркеры были обнаружены [1]. Однако, как оказалось на практике, большинство из этих маркеров непригодны для диагностики. Это связано с тем, что, во-первых, далеко не все эти фрагменты РНК попадают в кровь. Во-вторых, некоторые из них обладают низкой специфичностью, т.е. присутствуют в норме в крови здоровых доноров [2]. В настоящее время только один РНК-маркёр – ген ПСА рекомендован ВОЗ для скрининга и диагностики [1].

Тем не менее, существуют РНК, которые синтезируются во всех раковых клетках. Примером такого потенциального универсального онкомаркера является мРНК белковой субъединицы теломеразы. Как известно, этот фермент отвечает за синтез концевых участков хромосом (теломер) [3]. Его мРНК присутствует и в нормальных стволовых клетках, которые, подобно раковым клеткам, способны к неограниченному делению. Однако, в отличие от раковых клеток, стволовые клетки находятся в своих нишах и не распространяются по организму. Поэтому присутствие

\* - адресат для переписки

## РНК-ОНКОМАРКЕРЫ В КРОВИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

теломеразной мРНК там, где стволовых клеток быть не должно (например, в плазме крови) может служить указанием на наличие злокачественной опухоли [4]. Органоспецифические РНК-маркеры, циркулируют в крови при онкологических заболеваниях определенных органов. Так, присутствие в крови мРНК онкофетального белка альфафетапротеина является признаком гепатоцеллюлярной карциномы [5]. мРНК карциноэмбрионального антигена является маркером рака толстой кишки [6]. мРНК цитокератина 20 (белка эпителиальных клеток) также обнаруживается в крови при раке толстой кишки [6].

Данное исследование проводилось с целью разработки диагностической панели путём измерения в капиллярной крови пациентов уровня нескольких РНК-маркёров новообразований ЖКТ.

### МЕТОДИКА.

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

*Клинический материал.* Обследовано 86 пациентов с различными, гистологически подтвержденными формами злокачественных опухолей ЖКТ. Исследования проводились у пациентов, которым было показано оперативное удаление опухоли или её метастазов. Группа сравнения включала 20 практически здоровых доноров и 85 пациентов с неонкологическими заболеваниями, включая местную хирургическую инфекцию, холециститы, панкреатиты и гемангиомы печени.

*Объектом исследования* служила капиллярная кровь пациентов, взятая из пальца.

В экспериментах определяли мРНК следующих генов-онкомаркёров: теломеразы (mhtERT), альфа-фетопропротеина (mAFP), цитокератина-20 (mCK-20) и карциноэмбрионального антигена (mCEA).

*Выделение суммарного пула РНК.* 250 мкл крови из пальца забирали автопипеткой с пластмассовым наконечником и немедленно вносили в пробирку Эппендорф, содержащую 750 мкл триреагента LS фирмы "Sigma" (США). Образцы тканей того же объёма также помещали в триреагент. После перемешивания образцы хранили при -21°C в течение 1–20 суток. После размораживания из образцов удалялись остатки нерастворившейся ткани. В пробы вносили по 100 мкл 1,3-бром-хлорпропана ("Sigma"), перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 15 минут. Для разделения фаз пробы центрифугировали при 12000 g 15 минут при 4°C. Затем отбирали 250 мкл верхней водной фазы, которую переносили в чистые пробирки Эппендорф. Для осаждения РНК в пробирки добавляли по 250 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли стоять на 10 минут при комнатной температуре. Центрифугировали при 12000 g 8 мин при 4°C. После удаления супернатанта осадок промывали 1 мл 75% этанола с тем же режимом центрифугирования. Конечный осадок подсушивали на воздухе в ламинарном шкафу при комнатной температуре и растворяли в 30 мкл деионизированной воды, обработанной пирокарбонатом (DEPC) с добавлением ингибитора РНКаз в конечной концентрации 0,5 ед/мкл.

*Проведение реакции обратной транскрипции* осуществляли, как описано в инструкции к набору "Синтез первой цепи кДНК (рендом)", кат №0202 ф. Силекс (Россия). Синтезированная комплементарная ДНК (кДНК) использовалась для проведения ПЦР в реальном времени.

*ПЦРс детекцией продуктов в режиме реального времени.* Для флуоресцентной детекции продуктов реакции использовались меченные флуорофорами олигонуклеотиды – зонды TagMan. Подбор праймеров и зондов осуществлялся с использованием сообщений [7] для mhtERT, [8] для mAFP и [6] для mCEA и mCK-20. Необходимые олигонуклеотиды были синтезированы фирмой "СИНТОЛ" (Россия). Для проведения реакции готовили основную смесь, содержащую следующие компоненты: 50 мкл 2,5 мМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 50 мкл 10-кратного буфера для ПЦР

(500 мМ KCl, 150 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 0,5% глицерин, 0,1% Твин 20), 50 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мкл Taq ДНК-полимеразы 5 Ед/мкл с ингибирующей активностью антителами, по 10 мкл праймеров (финальная концентрация 0,6–0,8 мкМ) и 5 мкл зондов (конечная концентрация 0,1–0,2 мкМ) и 265 мкл деионизированной воды. В пробирки для ПЦР объемом 200 мкл помещали по 2 мкл образцов кДНК и 23 мкл основной смеси. Для того чтобы учесть возможное присутствие в образцах геномной ДНК, в контрольные пробы вместо кДНК вносили 2 мкл раствора исходной РНК, не подвергшейся реакции обратной транскрипции. ПЦР РВ осуществляли в приборе АНК-32К-4Ц (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия) в следующих условиях: плавление ДНК - 95°C, 90 сек – 1 цикл; (отжиг праймеров и элонгация цепей ДНК – 61°C, 50 сек + плавление - 95°C, 15 сек) – 40 циклов. Критический цикл и исходное количество копий кДНК определяли с помощью компьютерной программы, поставляемой вместе с прибором. Полученные результаты нормировались по экспрессии референтного гена β-актина в виде соотношения количества копий кДНК данного фактора к количеству копий кДНК β-актина. Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы STATISTICA, V6.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Все исследованные нами РНК-онкомаркеры были обнаружены в крови здоровых доноров, что согласуется с исследованиями, проведенными зарубежными авторами [2]. Однако у большинства онкологических пациентов уровень этих РНК-онкомаркеров был значительно повышен. В таблице 1 приведено количество пациентов с положительным, то есть, превышающим донорский, ответом на онкомаркеры.

Таблица 1. Количество и процентное соотношение пациентов онкологической группы с высоким уровнем РНК-онкомаркеров (положительный ответ).

Объект исследования/Онкомаркер	n	mhTERT	mAFP	mCEA	mCK-20
<b>Гепатоцеллюлярная карцинома</b>	<b>17</b>	<b>16 (94%)</b>	<b>13(76%)</b>	<b>-*</b>	<b>-</b>
<b>Опухоли Клякшина (холангиокарцинома)</b>	<b>14</b>	<b>11 (79%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Метастазы колоректального рака</b>	<b>25</b>	<b>23 (92%)</b>	<b>-</b>	<b>16(64%)</b>	<b>17 (68%)</b>
<b>Колоректальный рак</b>	<b>8</b>	<b>7 (88%)</b>	<b>-</b>	<b>5 (63%)</b>	<b>6 (75%)</b>
<b>Протоковый рак ПЖ</b>	<b>22</b>	<b>19 (86%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>14 (64%)</b>

Примечание: \* - прочерк означает, что определение данного показателя не производилось.

РНК-маркер mhTERT оказался наиболее универсальным. Его гиперэкспрессия обнаруживалась у всех пациентов онкологической группы и варьировала от 1,22 единиц по отношению к экспрессии мРНК β-актина при протоковом раке ПЖ до 5,63 ед. при наличии метастазов колоректального рака в печени (табл. 2). В крови доноров и пациентов группы сравнения также имелся некоторый уровень mhTERT, который был значительно ниже, чем в онкологической группе. Это, по-видимому, связано с непрерывными процессами пролиферации и репарации, происходящими практически в любом организме. Однако данное явление не снижает информативной ценности mhTERT, как универсального онкомаркера.

## РНК-ОНКОМАРКЕРЫ В КРОВИ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Таблица 2. Уровень онкомаркёров у доноров и пациентов. Представлен в виде отношения копий РНК исследованного маркёра и  $\beta$ -актина.

Объект\Онкомаркер	n	mhTERT	mAFP	mCEA	mCK-20
<b>Неонкологическая группа*</b>					
<b>Доноры</b>	<b>20</b>	<b>0,42±0,03</b>	<b>0,003±0,0004</b>	<b>0,002±0,0003</b>	<b>0,46±0,05</b>
<b>Гнойная хирургическая инфекции</b>	<b>18</b>	<b>0,58±0,07</b>	<b>0,002±0,0003</b>	<b>0,003±0,0005</b>	<b>0,61±0,04</b>
<b>Холециститы и панкреатиты</b>	<b>56</b>	<b>0,47±0,04</b>	<b>0,004±0,0002</b>	<b>0,004±0,0001</b>	<b>0,88±0,02</b>
<b>Гемангиома печени</b>	<b>11</b>	<b>0,50±0,06</b>	<b>0,004±0,0003</b>	<b>0,003±0,0004</b>	<b>0,33±0,04</b>
<b>Онкологическая группа**</b>					
<b>Гепатоцеллюлярная карцинома</b>	<b>17</b>	<b>4,07±0,51</b>	<b>0,61±0,05</b>	-	-
<b>Опухоли Кляккина (холангиокарцинома)</b>	<b>14</b>	<b>3,77±0,40</b>	<b>0,33±0,04</b>	-	-
<b>Метастазы колоректального рака</b>	<b>25</b>	<b>5,63±0,44</b>	-	<b>0,51±0,04</b>	<b>4,81±0,31</b>
<b>Колоректальный рак</b>	<b>8</b>	<b>5,18±0,50</b>	-	<b>0,46±0,05</b>	<b>3,77±0,40</b>
<b>Протоковый рак ПЖ</b>	<b>22</b>	<b>1,22±0,10</b>	-	<b>0,07±0,006</b>	-

Примечание: \* -  $0,06 \leq p \leq 0,3$  в сравнении с группой "доноры"; \*\* -  $0,0001 \leq p \leq 0,001$  в сравнении с группой "доноры".

РНК маркёр mAFP были обнаружены в крови пациентов с ГЦР (0,61 ед) и в меньшей степени у больных с холангиокарциномой (0,33 ед). В крови доноров и пациентов группы сравнения он присутствовал в следовых количествах или отсутствовал совсем.

Маркёр mCEA также практически не обнаруживался в крови доноров и пациентов группы сравнения. Его гиперэкспрессия наблюдалась при колоректальном раке и его метастазах в печени.

Гиперэкспрессия онкомаркёра mCK-20 обнаружена также у пациентов с колоректальным раком и его метастазах. Однако, в отличие от mCEA, он обнаруживался в крови доноров и пациентов группы сравнения, хотя и в значительно меньших количествах (табл. 2).

Проведённые исследования позволили нам оценить специфичность и чувствительность предлагаемых тестов (табл. 3). Как мы и предполагали, наибольшую специфичность и чувствительность проявил маркёр mhTERT. Мы установили, что чувствительность метода с использованием РНК-онкомаркёров можно значительно повысить при комбинированном определении нескольких мРНК. На основании наших исследований могут быть рекомендованы следующие комбинации: Гепатоцеллюлярная карцинома - mhTERT + mAFP; холангиокарцинома - mhTERT + mAFP; метастазы колоректального рака - mhTERT + mCK-20 + mCEA; протоковый рак ПЖ - mhTERT + mCK-20.

Таблица 3. Специфичность и чувствительность РНК-онкомаркёров.

Объект/Онкомаркер	n	mTERT	mAFP	mCEA	mCK-20
<b>Неонкологическая группа (специфичность)</b>					
<b>Доноры</b>	20	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)
<b>Гнойная хирургическая инфекция</b>	18	1 (94%)	0 (100%)	2 (89%)	4 (78%)
<b>Холециститы и панкреатиты</b>	56	2 (96%)	2 (96%)	3 (95%)	4 (93%)
<b>Гемангиома печени</b>	11	2 (82%)	4 (64%)	0 (100%)	0 (100%)
<b>Σ по всей группе</b>	105	5 (95%)	6 (94%)	5 (95%)	8 (92%)
<b>Онкологическая группа (чувствительность)</b>					
<b>Гепатоцеллюлярная карцинома</b>	17	16 (94%)	13 (76%)	-	-
<b>Опухоли Клярина (холецистокарцинома)</b>	14	11 (79%)	-	-	-
<b>Метастазы колоректального рака</b>	25	23 (92%)	-	16 (64%)	17 (68%)
<b>Колоректальный рак</b>	8	7 (90%)	-	5 (63%)	6 (75%)
<b>Протоковый рак ПЖ</b>	22	19 (86%)	-	14 (64%)	-
<b>Σ по всей группе</b>	86	76 (88%)	-	-	-

Сравнение данных по определению РНК-маркёров с результатами ИФА-тестов показало, что оба метода обладают примерно одинаковой специфичностью. Однако метод определения РНК-маркёров отличается более высокой чувствительностью и выявляет болезнь в тех случаях, когда традиционные онкомаркёры дают отрицательный результат.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Отличительной особенностью наших исследований является использование малого (250 мкл) объема капиллярной крови в качестве образца. Все работы, ранее проводимые в этой области, основаны на использовании больших (5–10 мл) образцов венозной крови. Некоторые исследователи применяли также концентрирование форменных элементов крови путём её фракционирования в градиенте плотности. Использование данных приёмов основано на том, что эти авторы стремились обнаружить единичные циркулирующие раковые клетки и опасались, что они не окажутся в малом объёме крови. Между тем в литературе имеются сведения, что опухоль и её метастазы способны выбрасывать в циркуляцию не только единичные клетки, но и продукты их деградации, иммунные комплексы, а также нуклеиновые кислоты, в том числе и специфические РНК [9]. Эти РНК связываются с белками плазмы и поверхности



форменных элементов крови, что предохраняет их от деградации. Следовательно, их можно детектировать в лизатах небольших образцов крови [10]. Сравнительные исследования, проведённые нами с образцами венозной крови, показали примерно те же результаты, что и при использовании капиллярной крови, взятой из пальца. Таким образом, наш метод оказывается малоинвазивным и достаточно информативным для скрининга и первичной диагностики. Метод также применим в клинике для послеоперационного мониторинга выброса фрагментов опухоли в кровотоки, оценки угрозы метастазирования и в качестве вспомогательного метода дифференциальной диагностики. По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

1. Специфические РНК- онкомаркёры можно определять в небольших образцах капиллярной крови пациентов.
2. РНК-онкомаркёры в определённых количествах могут присутствовать в крови доноров и неонкологических пациентов. Однако их уровень у пациентов онкологической группы значительно выше. Следовательно, РНК-онкомаркёры могут быть использованы для диагностических целей при условии установления границ клинической нормы.
3. РНК теломеразы-ревертазы *hTERT* является универсальным онкомаркёром, так как гиперэкспрессируется при наличии злокачественных образований любого типа.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Sturgeon C.* (2002) *Clin. Chem.*, **48**, 1151-1159.
2. *Shitrit D., Zingerman B., Shitrit A.B., Shlomi D., Kramer M.R.* (2005) *Oncologist*, **10**, 501-507.
3. *Morin G.B.* (1989) *Cell*, **59**, 521-529.
4. *Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W.* (1994) *Science*, **266**, 2011-2015.
5. *Matsumura M., Shiratori Y., Niwa Y., Tanaka T., Ogura K., Okudaira T., Imamura M., Okano K., Shiina S., Omata M.* (1999) *J. Hepatol.*, **31**, 332-339.
6. *Guller U., Zajac P., Schnider A., Bo B., Vorburger S., Zuber M., Spagnoli G., Oertli D., Maurer R., Metzger U., Harder F., Heberer M., Marti W.* (2002) *Annals Surg.*, **236** (6), 768-776.
7. *Dasi F., Lledo S., Garcia-Granero E., Ripoll R., Marugan M., Tormo M., Garcia-Conde J., Alino S.* (2001) *Lab. Invest.*, **81**, 767-769.
8. *Siu T.C., Chi L., Jeremy P.H., Yuk T.L., Ying C.I., Jenny C.Y., Sheung T.F.* (2006) *Neoplasia*, **8**, 696-701.
9. *Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Хоффман А.Л., Тамкович С.Н., Старики А.В., Брызгунова О.Е., Пермякова В.И., Варнеке Е., Шакиель Г., Власов В.В., Лактионов П.П.* (2008) *Биомед. химия*, **54**, 94-103.
10. *Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П.* (2008) *Мол. биол.*, **42**(1), 12-23.

Поступила: 02. 07. 2009.

**THE STUDY OF RNA MARKERS IN BLOOD OF PATIENTS WITH MALIGNANT TUMORS  
OF GASTROINTESTINAL TRACT**

*A.G. Globa, V.S. Demidova, O.N. Dikova, V.A. Vishnevskiy, A.I. Shchegolyev*

Vishnevsky Institute of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Bolshaya Serpukhovskaya, 27,  
Moscow, Russia; tel.: (495) 236-20-52; e-mail: aggloba@mail.ru

In order to develop a diagnostic panel, mRNA levels of tumor marker genes have been evaluated in capillary blood of patients with various malignant tumors of the gastrointestinal tract (GIT) by means of the method of reverse transcription combined with real-time PCR with detection of reaction products using TaqMan probes. Use of small volumes of capillary blood did not decrease sensitivity of this method. RNA expression of telomerase (mhTERT), alpha-fetoprotein (mAFP), carcinoembryonic antigen (mCEA) and cytokeratin-20 (mCK-20) was higher in most patients with tumors. Blood of donors or non-oncological patients contained much lower (trace) amounts of the RNA markers. The RNA markers are characterized by reasonably high specificity and sensitivity acceptable for diagnostic application. The mhTERT marker was the most universal one and exhibited the highest specificity and sensitivity. Combined determination of several RNA markers increased sensitivity of this method. It is concluded that determination of RNA markers in small volumes of capillary blood may be used for screening, primary diagnostics, and postoperative monitoring.

**Key words:** polymerase chain reaction, telomerase, tumor markers, carcinoma.