

МикроРНК В ДИАГНОСТИКЕ РАКА

Доктор биологических наук Николай КОЛЕСНИКОВ,
ведущий научный сотрудник,
кандидат биологических наук Сергей ТИТОВ, научный сотрудник,
академик Игорь ЖИМУЛЕВ, директор,
Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
(Новосибирск)

Выявлять рак на самых начальных его стадиях — одна из важнейших задач практической медицины: чем раньше это удастся, тем больше шансов на излечение. Недавнее открытие нового класса молекул РНК — микроРНК (миРНК) — совершило переворот в наших представлениях о регуляторном потенциале генома и повлекло за собой разработку новых подходов в ранней диагностике онкологических заболеваний. Эти молекулы можно использовать в качестве биомаркеров, помогающих ответить на многие вопросы, в том числе о вероятности развития того или иного типа рака, прогноза рецидива и т.д. Потенциально они могут стать основой и терапевтических средств.

Рак — очень сложное заболевание, к тому же сопровождающееся высокой летальностью. По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно в мире от него погибают более 7,5 млн человек. В России на начало 2011 г. на учете в онкологических учреждениях состояли свыше 2,6 млн пациентов, а к концу того же года уже 2 900 629, т.е. 2,0% населения страны. Каждый третий раковый больной

умирает в течение года после постановки соответствующего диагноза, поскольку злокачественные новообразования в 60% случаев выявляются на III–IV стадиях развития, когда эффективное лечение уже затруднительно.

Но рак — не приговор, с ним можно и нужно бороться, и при современном уровне медицины он излечим. Главная задача — научиться распознавать зло-

качественное перерождение клеток на самых ранних стадиях. К сожалению, существующие традиционные методы диагностики этого не позволяют. Поэтому во всем мире ведут поиск более эффективных подходов к решению данной проблемы на основе передовых технологий молекулярной биологии*. Прорыв в этом направлении наметился с недавнего открытия ранее неизвестного класса малых некодирующих молекул РНК — микроРНК (миРНК), которые «дирижируют» множеством биологических функций. К настоящему времени показано, что дерегуляция экспрессии отдельных микроРНК или их групп, проще говоря, сбой в их «работе» ведет к патологическим состояниям, в том числе и к онкологическим заболеваниям человека.

«МАЛЫЕ, НО УДАЛЫЕ»

Напомним, существуют несколько классов РНК-молекул, отличающихся не только структурой, размерами, но и выполняемыми в клетке функциями. Так, информационные РНК (иРНК) служат посредниками, переносящими «сообщения» из ядра в цитоплазму, а, например, рибосомальные РНК (рРНК) регулируют основные этапы белкового синтеза. По сравнению с этими молекулами интересующие нас миРНК значительно меньше по своим размерам, состоят из одной цепочки, насчитывающей ~ 22 нуклеотида. Кодируются они небольшими участками ДНК и выявлены в геномах животных, растений и вирусов. Так, у человека обнаружено уже 1600 генов миРНК, способных в целом контролировать работу 60% белок-кодирующих генов. Свою функцию — регулировать экспрессию последних на транскрипционном и посттранскрипционном** уровнях — молекулы миРНК выполняют посредством комплементарного взаимодействия с участками матричной РНК, что приводит к выключению соответствующих генов.

МикроРНК были открыты профессором Университета штата Массачусетс (США) Виктором Амбросом в 1993 г. у нематоды (круглого червя) как гены, участвующие в регуляции процессов развития, однако сразу не были оценены по достоинству. Но уже в 2001 г. молекулу микроРНК, по версии журнала *Science*, признали «молекулой года»*** (заметим, что в том же году мировой научной общественности был представлен черновой вариант расшифровки генома человека). Открытие нового класса молекул РНК привело к обнаружению «темной» части генома, мизерной по занимаемому месту (всего 0,001% генома), но зато играющей ведущую роль в процессах регуляции как в отдельной клетке, так и на уровне организма в целом.

*См.: Ф. Киселев. Новое в молекулярной диагностике рака. — Наука в России, 2008, № 1 (прим. ред.).

**Транскрипция — процесс копирования генетической информации с молекулы ДНК на РНК, в частности на информационную (или матричную) РНК (иРНК или мРНК), содержащую информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков (прим. ред.).

***В 2008 г. Виктор Амброс, профессор генетики Гарвардского университета (США) Гэри Рувкун и профессор ботаники Кембриджского университета (Великобритания) Дэвид Болкомб за исследования микроРНК были удостоены престижной премии Альберта Ласкера в области биомедицинских наук (прим. ред.).

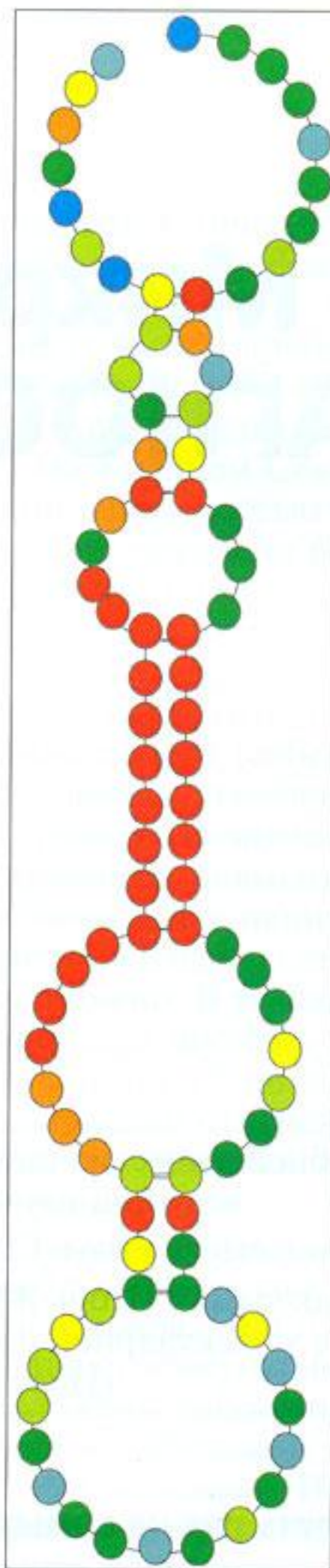


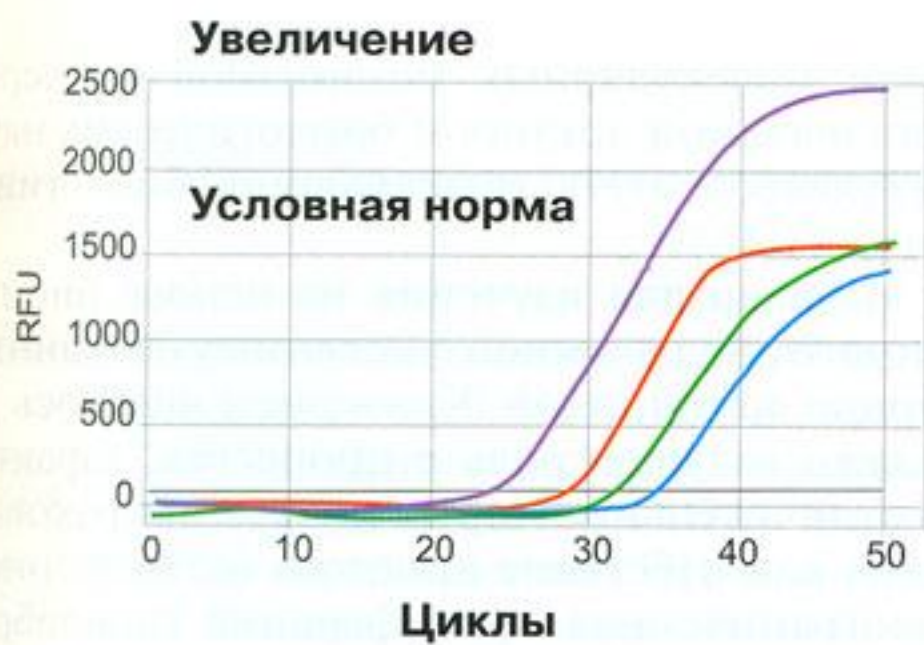
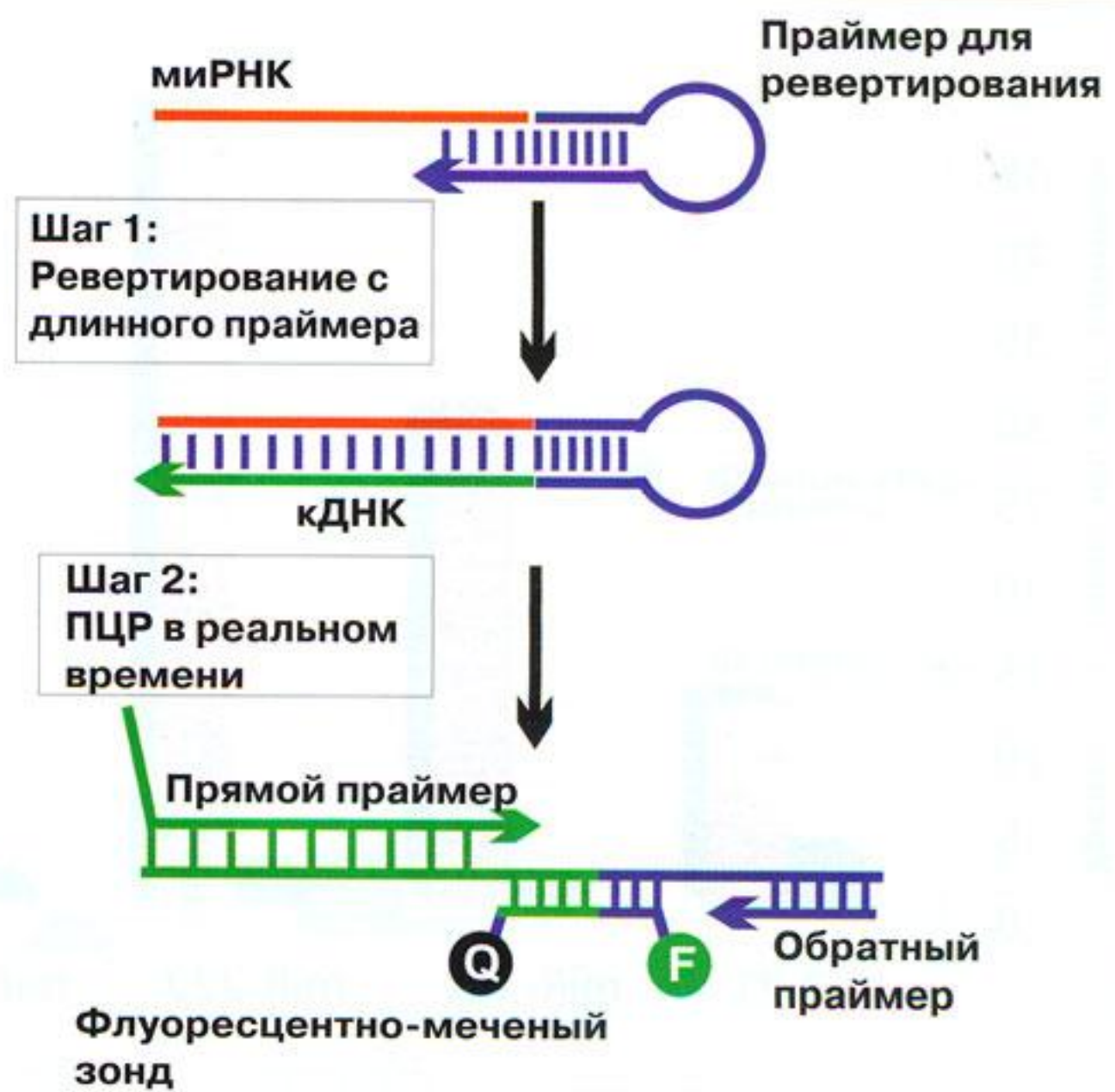
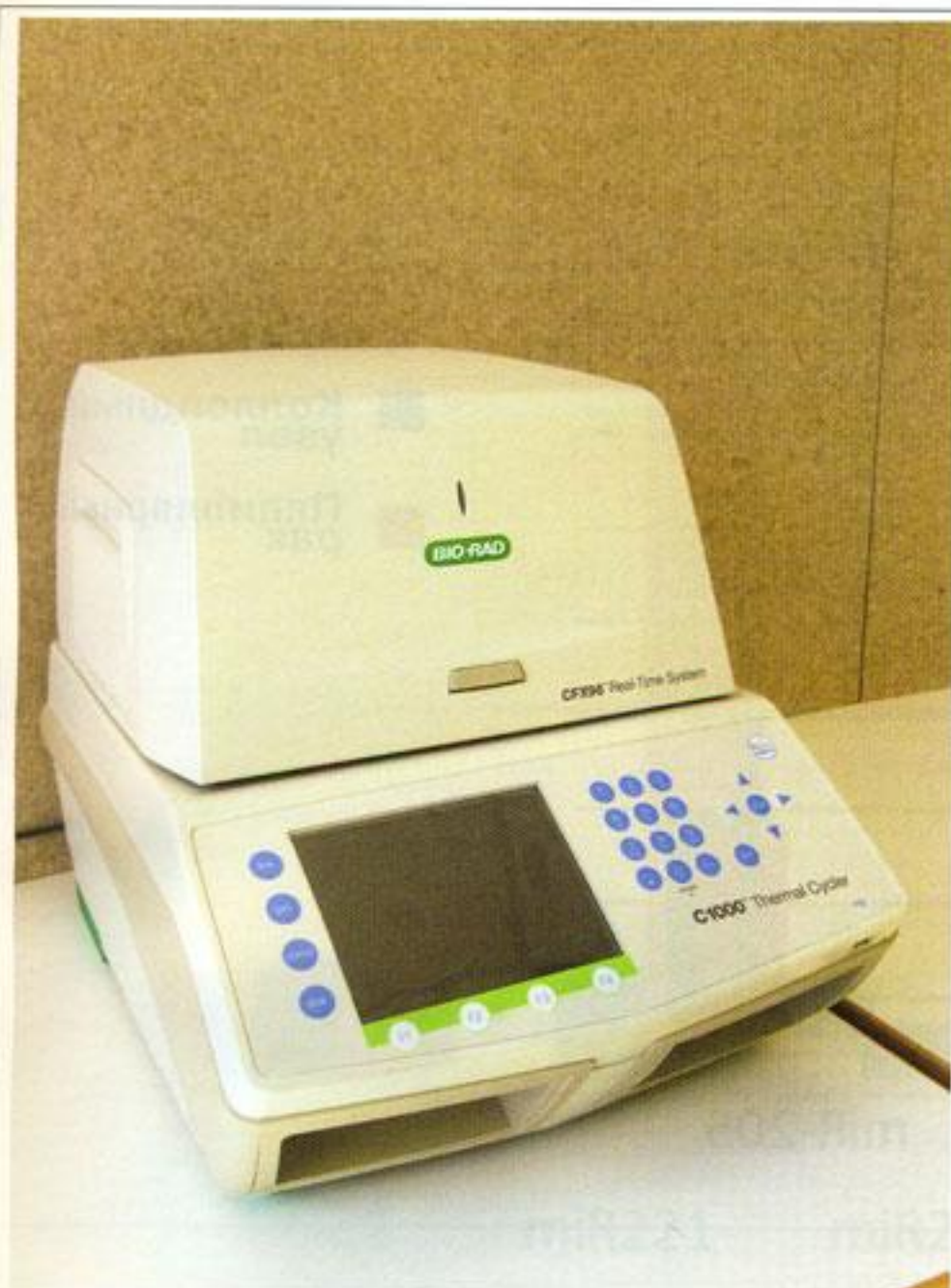
Схема миРНК-146, вовлеченной в регуляцию иммунной системы и воспалительных процессов. Разными цветами обозначена степень консерватизма нуклеотидной последовательности, в частности, красным — наиболее консервативные нуклеотиды, т.е. сохраняющиеся неизменными на протяжении миллионов лет эволюции.

Схема детекции миРНК с помощью обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени у одного пациента. RFU (Relative Fluorescent Unit) — относительные единицы флуоресценции; U6 — малая РНК, используемая как маркер, по отношению к ней определяют уровень исследуемых миРНК; ревертирование — химическая реакция построения обратной цепи ДНК по РНК; кДНК — комплементарная ДНК, синтезированная по мРНК.

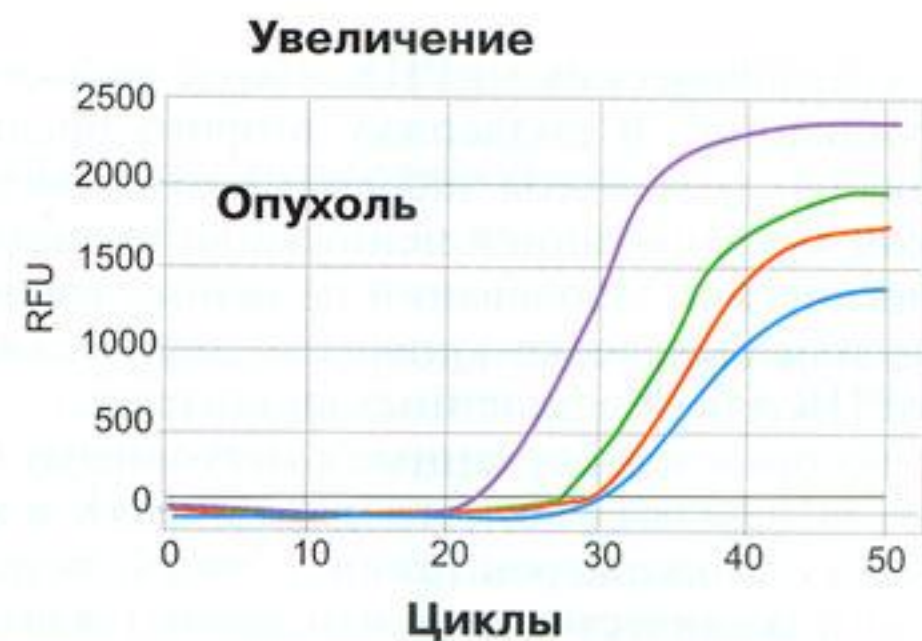
МиРНК служат «глобальными переключателями» генома, координированно контролируя множественные метаболические пути от момента зарождения организма. Как выяснилось, в одной клетке экспрессируются более 1000 миРНК. Многочисленные данные однозначно свидетельствуют о критической роли этих молекул в ключевых процессах эмбрионального развития, пролиферации и дифференцировки клеток, старения, иммунном и стрессовом ответах. Дальнейшие исследования показали: миРНК могут выполнять роль не только посттрансляционных негативных регуляторов, т.е. «выключателей» генной активности, но, возможно, и активаторов транскрипции и трансляции*.

Дерегуляция, т.е. сбой миРНК (по сравнению с нормой), наблюдается при различных заболеваниях, в том числе онкологических. Множество экспериментов свидетельствует в пользу того, что каждый

*Трансляция — процесс синтеза белка из аминокислот на матрице информационной (матричной) РНК (мРНК) (прим. ред.).

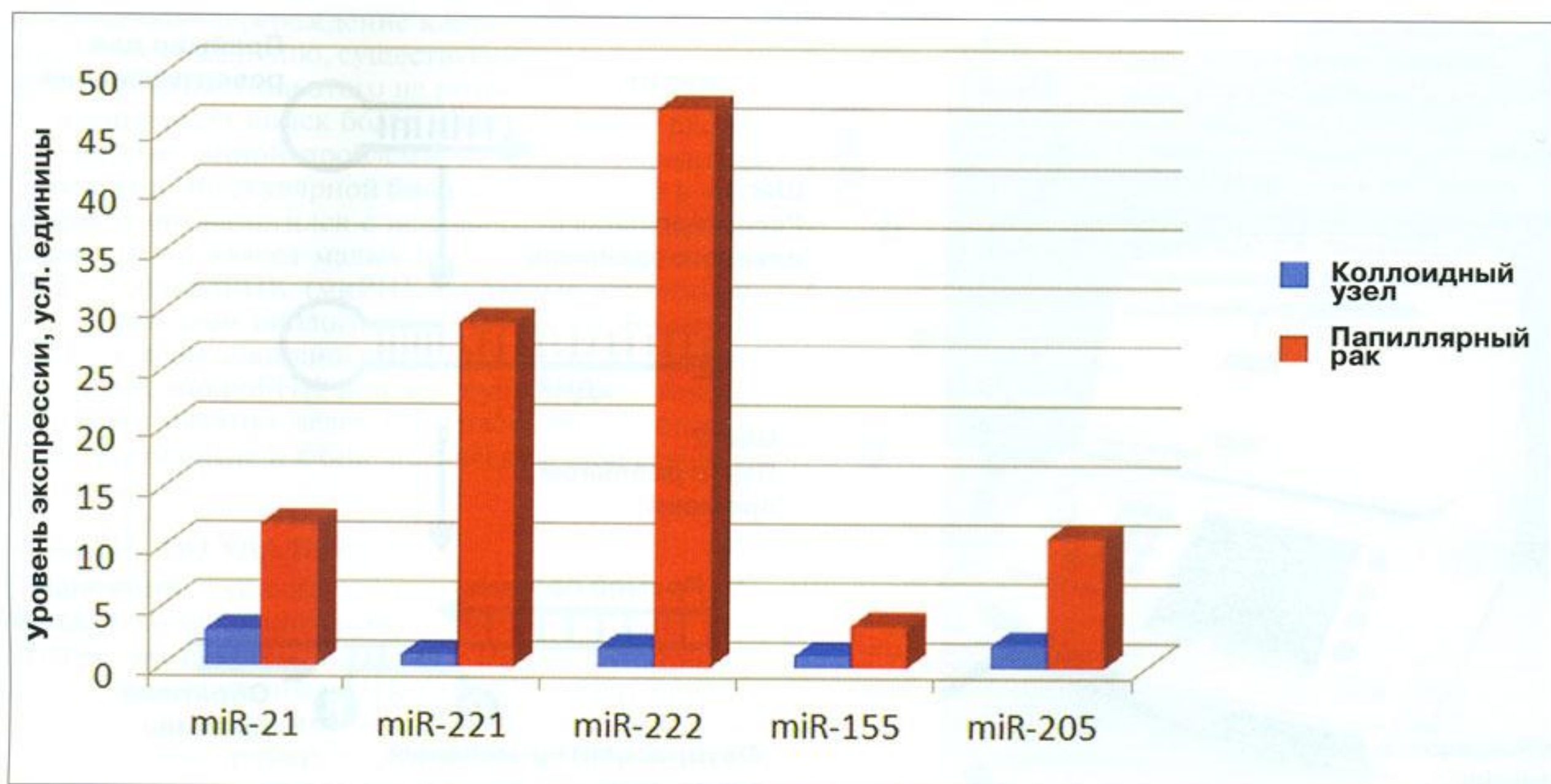


- miR146
- miR21
- miR221
- U6



тип опухолей характеризуется уникальным набором миРНК, своеобразным штрих-кодом, который можно выявить чувствительными методами, базирующимися на полимеразной цепной реакции (ПЦР). С другой стороны, показано: несмотря на то, что типов рака насчитывается около 250, существуют как «специфические», так и «общие» миРНК — дерегуляция последних зарегистрирована во всех типах злокачественных клеток. В настоящее время идентифицировано 84 таких «общих» молекул, относящихся к «онкомиру», вовлеченному в канцерогенез, а профили их экспрессии предположительно коррелируют с диагнозом, стадией, прогрессией опухоли или прогнозом развития различных раковых заболеваний. Кроме того, последние исследования показали, что микроРНК не только ассоциированы с различными типами опухолей, но могут сами выступать в роли онкогенов и супрессоров новообразований, т.е. быть первопричиной злокачественных превращений наряду с соматическими мутациями в генах.

Есть еще два фактора, делающих миРНК привлекательными для дальнейших исследований. Первый носит практический характер и связан со стабильностью миРНК (в отличие от мРНК), позволяющей выделять их не только из биообразцов (операционный материал, биологические жидкости), но и из фиксированных препаратов, что открывает широкие возможности для сравнительного анализа. Второй фактор связан с обнаружением циркулирующих в кровяном русле стабильных миРНК, находящихся в свободном состоянии, т.е. вне клетки. Более того, продемонстрировано, что раковые клетки высвобождают миРНК — их можно обнаружить в плазме или сыворотке крови в составе экзосом (внеклеточных структур, гетерогенных по составу веществ). Впрочем, роль циркулирующих в крови миРНК, выделяемых раковой клеткой, еще не выяснена до конца. Открыт и вопрос, являются ли такие молекулы продуктом распада после гибели злокачественных клеток или происходит активная секреция послед-



Сравнение уровней экспрессии миРНК при папиллярном раке и коллоидном узле щитовидной железы.

ними специфических миРНК в ходе межклеточной коммуникации? В поддержку второго предположения говорят результаты экспериментов, связанных с поиском методов ранней неинвазивной диагностики онкологических заболеваний на основе выявления в плазме или сыворотке крови специфических онкомикроРНК для определенных видов рака.

Таким образом, полученные к настоящему времени данные позволяют рассматривать миРНК в качестве идеальных биомаркеров (стабильность, тканеспецифичность, количественное измерение) для выявления разных злокачественных образований, прогноза их развития, эффективности терапевтического лечения, а также в качестве мишеней потенциального воздействия на опухолевые процессы. Правда, приходится констатировать, что экспериментальные работы по этому направлению достойно финансируются и интенсивно развиваются в основном за рубежом. В нашей стране они единичны как в учреждениях РАН, так и РАМН.

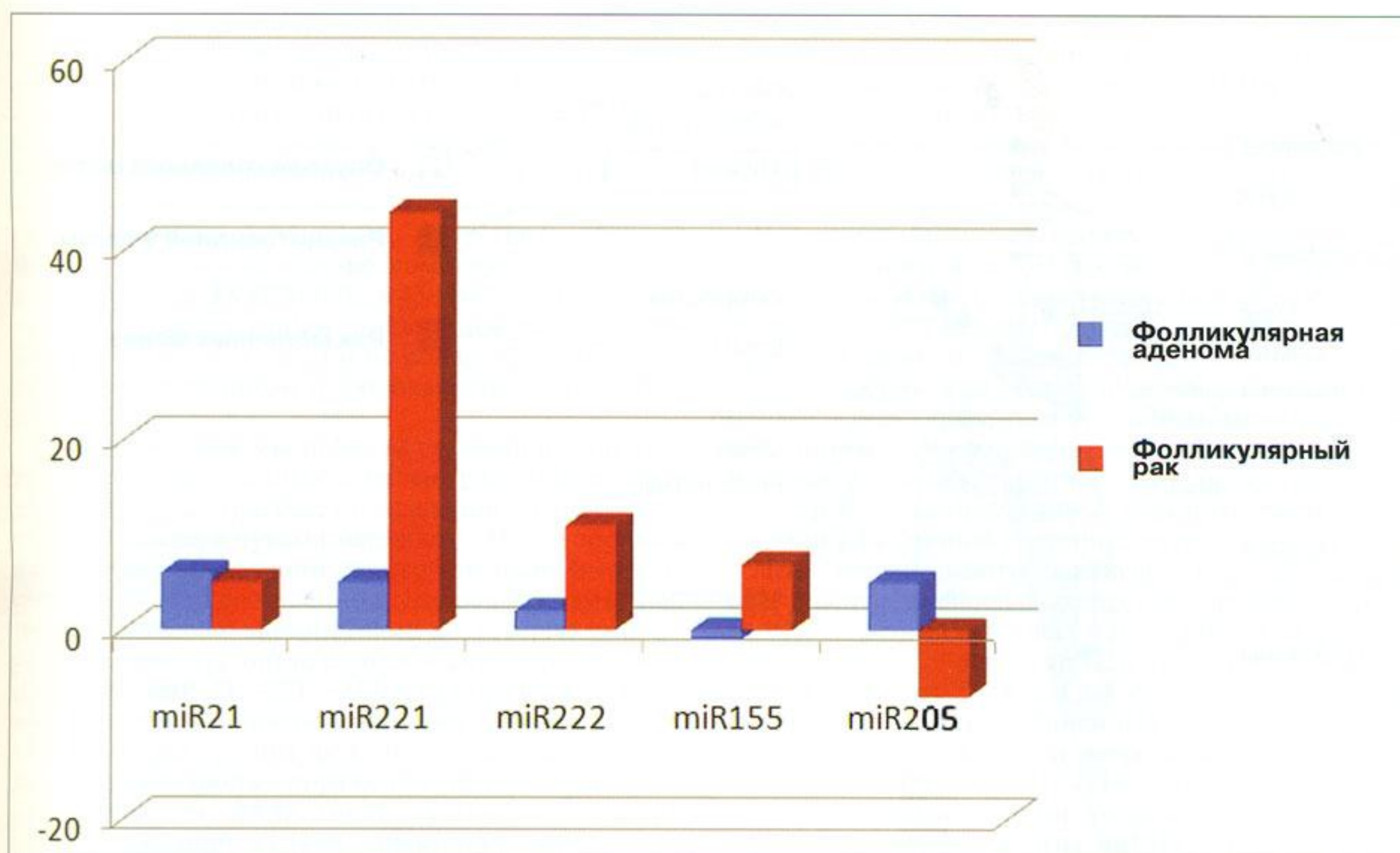
МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

Выяснение роли микроРНК в канцерогенезе и разработка подходов к их использованию в качестве диагностических биомаркеров при онкологических заболеваниях человека — таковы направления исследований, развиваемых в настоящее время в Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН. Проводим их в тесном сотрудничестве с ЗАО «Вектор-Бест», медицинскими учреждениями Новосибирска и области (городская клиническая больница № 1, областной онкологический диспансер, клиника нейрохирургии Научно-исследовательского института травматологии и ортопедии Минздрава РФ) и

лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза, возглавляемой доктором биологических наук Людмилой Гуляевой (НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН).

МиРНК выбрали для изучения на основе биоинформационного анализа многочисленных баз данных и литературных источников. Критерием являлось их участие и даже ведущая роль в процессах, характеризующих отличительные черты поведения раковых клеток, таких как избегание апоптоза (естественной смерти), неограниченная пролиферация (новообразование), инвазия и метастазирование, ангиогенез (образование новых кровеносных сосудов). Первоначально для анализа отобрали пять миРНК, дифференциально экспрессирующихся в разных типах опухолей: miR-21, -221, -222, -155, -205*. Позднее в анализ включили еще 15 онкогенных миРНК — их использовали для скрининга разных гистотипов опухолей щитовидной и молочной желез, головного мозга в ходе поиска биомаркеров. Операционный материал, сопровождаемый официальным заключением гистологического анализа, предоставила городская клиническая больница №1 Новосибирска. При этом соблюдались этические нормы законодательства РФ, в соответствии с которыми использование биологического материала в научных целях допускается на условиях анонимности с письменного согласия пациента. Опухолевые и нормальные ткани были получены от 180 пациентов с различными типами новообразований щитовидной железы: фолликулярные аденома и карцинома, папиллярная карцинома,

*В соответствии с правилами номенклатуры международных баз данных миРНК числом обозначается идентификатор типа миРНК в геноме человека или животного (прим. ред.).



Сравнение уровней экспрессии миРНК при фолликулярной аденоме и фолликулярном раке.

опухолеподобные поражения. В работе использовали количественный метод ПЦР-анализа, проводимого с помощью специального прибора — амплификатора CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). Важно подчеркнуть, что для выделения миРНК из операционного материала использовали отечественный набор реагентов «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

ВЫЯВЛЕНИЕ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

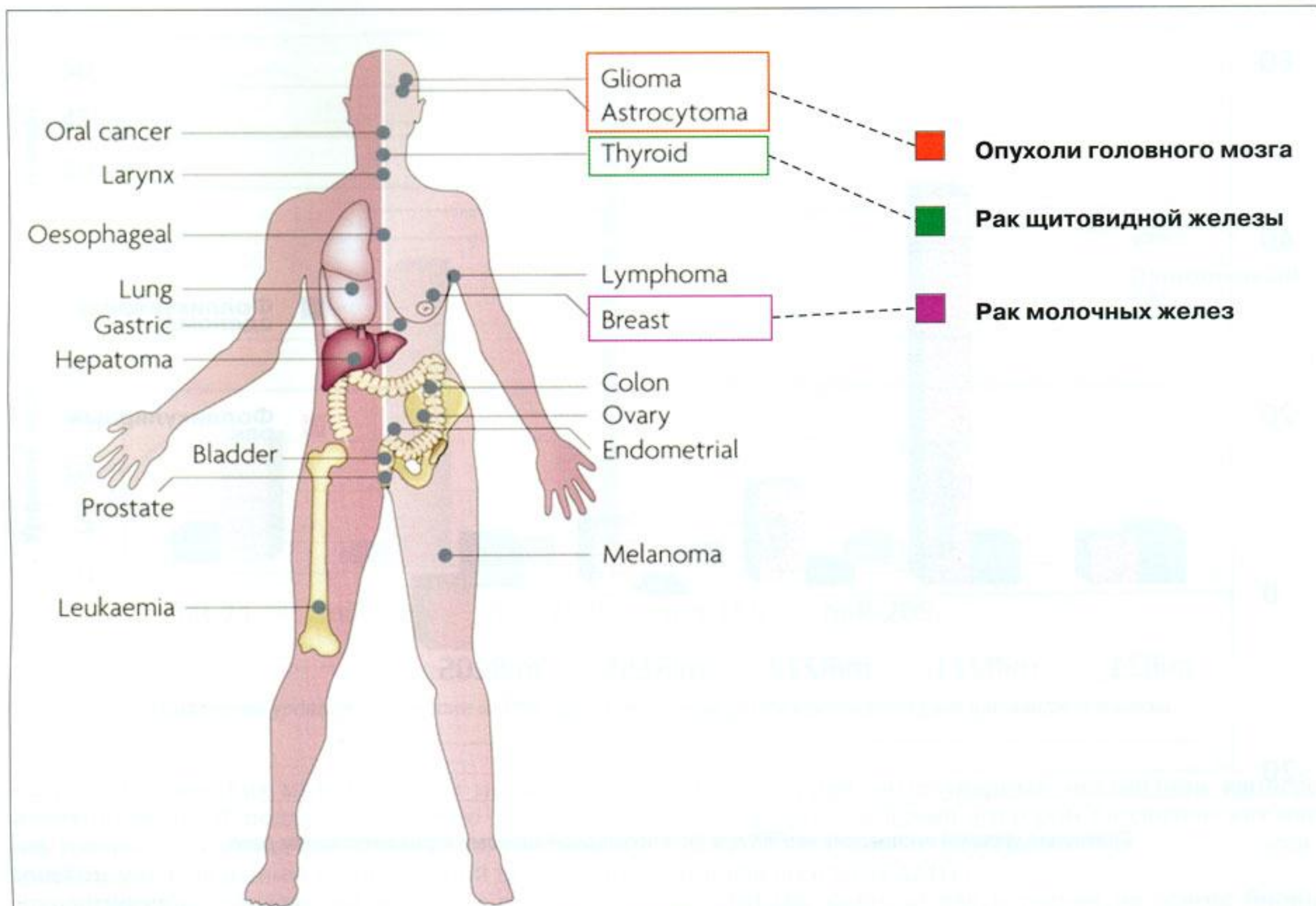
Щитовидная железа — самая крупная из эндокринных — синтезирует гормоны тироксин, трийодтиронин, тиреокальцитонин. Все они секретируются в кровь, поступая с ней в каждую ткань организма и регулируя обмен веществ, температуру тела, деятельность мозга, нервной системы, половых и молочных желез, сердца, мышц, других органов. Нарушение работы этой железы приводит к многочисленным заболеваниям миллионов людей, часто даже не подозревающих об истинной причине возникновения своих недугов.

Эпителиальные опухоли щитовидной железы подразделяются в первую очередь на доброкачественные и злокачественные. Среди последних наиболее распространен папиллярный рак (80% случаев рака щитовидной железы) — он встречается в любом возрасте, но у женщин втрое чаще, чем у мужчин. На фоне доброкачественной патологии — многоузлового

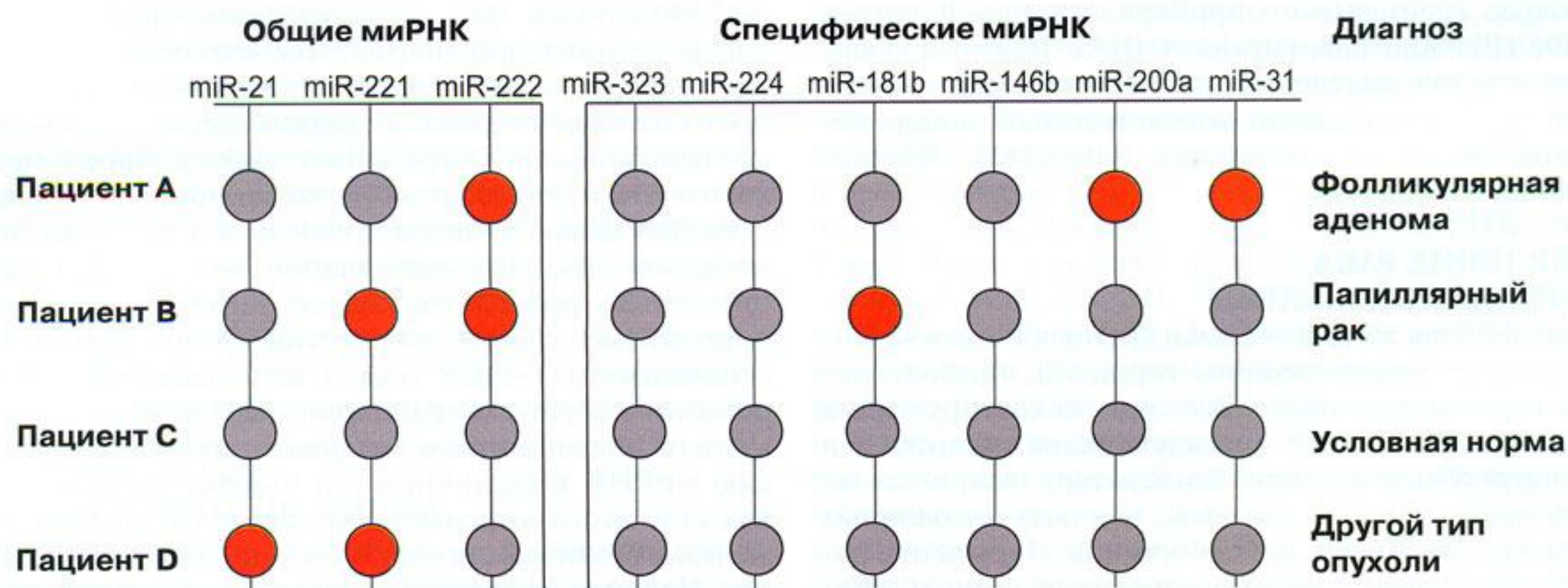
зоба, аутоиммунного тиреоидита и узелков — рак щитовидной железы возникает в большом числе (от 30 до 50%) случаев. Что соответственно ставит вопрос о дифференциальной диагностике этих образований от раковых патологий, в особенности при неопределенности цитологического анализа материала в 15–30% случаях биопсий. Остро встает также вопрос о необходимости и оправданности операционного лечения.

Нашей целью являлся поиск потенциальных биомаркеров опухолей щитовидной железы. Для этого предстояло решить несколько задач — отработать определение уровня экспрессии зрелой микроРНК с помощью ОТ-ПЦР (метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) в реальном времени на операционном материале, сравнить экспрессию миРНК в различных патоморфологических типах чаще всего встречающихся опухолей щитовидной железы, различающихся по степени злокачественности. Наконец, разработать подходы к созданию диагностической панели, т.е. набора биомаркеров на основе микроРНК и отдельных соматических мутаций.

В итоге, во-первых, мы провели сравнительный анализ уровня экспрессии 12 онко- и туморсупрессорных (подавляющих разрастание ткани) миРНК в разных гистопатологических типах опухолей щитовидной железы человека — опухолеподобных поражениях, доброкачественных и злокачественных новообразованиях. Во-вторых, выявлены специфические профили миРНК, характерные для опухолеподобных



Панель миРНК



поражений, аденом, аутоиммунных заболеваний, сопровождающихся разрушением органов и тканей организма под действием собственной иммунной системы, папиллярной, фолликулярной, медуллярной карцином и анапластического рака щитовидной железы. Экспрессия miR-21, -221, -222 достоверно различается при доброкачественных узловых образова-

Применение миРНК в диагностике злокачественных опухолей и прогнозировании их развития. Красный цвет — опасность (выявлена дисрегуляция миРНК), серый — изменения в пределах нормы.

ниях и карциномах по сравнению с условно нормальными прилежащими тканями. При раке характерно повышение уровня тех же миРНК (от 4 до 100 раз в сравнении с нормой) и прогностической миРНК — миР-146б. Незначительные изменения уровней этих миРНК отмечены в коллоидном узле. А при фолликулярных неоплазиях выявлен широкий диапазон соответствующих изменений. В-третьих, образцы были типированы на наличие соматической мутации в протонкогене *BRAF* V600E, в 45–60% случаев выявляемой (по литературным данным) при папиллярном раке щитовидной железы и не обнаруженной в фолликулярной карциноме и доброкачественных узелках этой железы.

На втором этапе мы провели статистический анализ полученных данных с целью разработки диагностического алгоритма, определения его точности, специфичности и чувствительности. Задача состояла в надежном определении двух групп: «рак» и «отсутствие рака». Что собственно и удалось показать. Так, группа образцов с карциномами достоверно отличается от случаев с опухолеподобными поражениями по уровню миР-21, -221, -222, а от образцов с аденомой — по уровню предыдущих трех, а еще миР-205, -222. Для всей группы фолликулярных аденом, как для опухолеподобных поражений, не выявлено мутаций по онкогену *BRAF*, тогда как для папиллярного рака щитовидной железы характерно наличие мутации в 81% случаев. Это свидетельствует о том, что мутация по указанному гену повышает вероятность отличия доброкачественных опухолей от злокачественных новообразований.

Далее для создания оптимизированного алгоритма, позволяющего дифференцировать по спектру миРНК группы «рак» и «отсутствие рака», мы провели сравнительный анализ полученных данных с помощью различных специальных программ. В итоге выявили специфические профили экспрессии миРНК, характерные для разных гистотипов опухолей, отличающихся также по наличию соматической мутации в онкогене *BRAF*. Благодаря разработанному алгоритму теперь можно с высокой точностью сказать: есть рак или он отсутствует. Но, разумеется, встает вопрос, а как результаты этих исследований реализовать в практической медицине, на уровне амбулатории? Задача нелегкая, но уже намечены подходы к созданию диагностической и прогностической панели на основе микроРНК.

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ОПУХОЛИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Рак молочной железы — одна из превалирующих злокачественных опухолей у женщин, но фенотипически она отличается многообразием, патологические и молекулярные ее характеристики варьируют. Уточнить диагноз можно с помощью миРНК. Мы показали, что существует различие между их экспрессией при инфильтрирующем протоковом раке молочной железы и при фибroadеноме (доброкачественной опухоли), с учетом стадий развития болезни. Показано также, что миРНК могут быть использова-

ны в качестве контроля проводимой неоадьювантной (вспомогательной) терапии. Выявлен уникальный профиль экспрессии всего набора миРНК в зависимости от типа и интенсивности проводимого предоперационного лечения. В частности, наблюдаются различия показателей миРНК при лучевой и химиотерапии, а также при смешанных типах лечения.

И наконец, об исследованиях, связанных с опухолями головного мозга. Известно, что они представляют собой гетерогенную группу новообразований, различающихся между собой по клеточному составу, происхождению и подразделяющихся в первую очередь на доброкачественные и злокачественные. Наиболее распространенные — глиомы, менингиомы и невриномы — и составили предмет нашего сравнительного анализа. Операционный материал — опухолевые и нормальные ткани — был получен от 70 пациентов с различной гистопатологией.

Цель нашей работы заключалась в сравнительном анализе профилей экспрессии набора из семи миРНК в разных опухолях и нормальных тканях головного мозга, определении специфических характеристик панели миРНК для дифференцировки разных гистотипов, т.е. типов тканей. Нам удалось показать, что для анапластической астроцитомы характерно падение уровня миР-221, -222 в сравнении с условно нормальными тканями, тогда как в менингиомах изменение количества этих миРНК мало отличается от нормы. Наибольшие значимые изменения уровня как в сторону увеличения, так и падения выявлены для миР-155, -451 в зависимости от степени злокачественности, что может иметь прогностическое значение при развитии заболевания.

Таким образом, в ходе исследований выявлены специфические профили экспрессии миРНК, характерные для разных гистотипов опухолей и в зависимости от степени злокачественности. Намечены подходы к созданию диагностической и прогностической панели на основе миРНК, необходимость которой диктуется отсутствием скрининговых методов анализа, которые можно было бы внедрить и проводить на амбулаторном этапе. Это позволило бы вовремя провести лечебные мероприятия, будь то хирургическое лечение или адьювантная терапия, а также продлить жизнь пациента и в значительной мере повысить качество его жизни. Возможно, такой подход стал бы эволюционным толчком и в лечении рака.

Результаты нашей работы могут найти применение в следующих областях медицинской практики: прежде всего это ранняя диагностика, определение гистотипа опухоли, стадии ее развития, потенциала к метастазированию, а еще — контроль эффекта терапевтического воздействия (химио- и радиотерапия), прогноз выживаемости.

Иллюстрации предоставлены авторами