

Л.М. Ковалевська¹
Т.В. Задворний¹
Т.А. Малишева²
С.С. Кальман¹
Н.Ю. Лук'янова¹
О.В. Кашиба¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

²Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Ключові слова: злоякісні новоутворення, експресія генів, сироватка крові, пухлинна тканина, кількісна ПЛР, позаклітинна РНК.

ПОРІВНЯННЯ ВІДНОСНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У ПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ ТА В СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА РАК

Мета: розробити методику для вивчення рівня відносної експресії генів на рівні позаклітинної РНК, виділеної із сироватки крові і загальної РНК, отриманої зі зразків пухлинної тканини хворих на рак, а також на рівні білка в тканинах злоякісних новоутворень. **Об'єкт і методи:** зразки сироватки крові та операційного матеріалу 5 хворих на гліобластоми мозку та сироватки крові 4 умовно здорових донорів. Білки MRPS18-1 і MRPS18-2 визначали імуногістохімічним методом. Статистичний аналіз проводили за допомогою програми GraphPadPrism9. **Результати:** показано, що для гена MRPS18-2 існує суттєва різниця в рівнях позаклітинної мРНК у пацієнтів з гліомами головного мозку та умовно здоровими донорами. Експресія гена MRPS18-2 на рівні мРНК не суттєво відрізняється в сироватці крові і в пухлинній тканині, що робить ген MRPS18-2 потенційним маркером пухлинного процесу. **Висновки:** отримані нами дані показують принципову можливість виділення достатньої для детекції методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції кількості позаклітинної мРНК із сироватки крові хворих на рак. Крім даного пілотного дослідження, слід провести роботу на більшій кількості пацієнтів, а також на зразках хворих із різними нозологічними формами, такими, як рак передміхурової та молочної залози з метою розробки панелі неінвазивних молекулярних маркерів діагностики та/або прогнозу перебігу онкологічних захворювань.

Рання діагностика злоякісних новоутворень є наріжним каменем успішного лікування хворих. За останнє десятиліття людство досягло великих успіхів у сфері своєчасного виявлення та лікування хворих на рак, а також у профілактичних заходах, спрямованих на попередження таких хвороб. Втім, наразі боротьба з онкологічними захворюваннями залишається однією з актуальних та складних проблем сучасної медицини. Це пов'язано як із зростанням кількості захворювань, так і виявленням злоякісних новоутворень у все молодшій віковій категорії пацієнтів. Згідно з даними Міністерства охорони здоров'я в Україні станом на 2021 р. налічується близько 1 млн хворих на рак, причому за 2019 р. з'явилося 138 509 нових пацієнтів, і, на жаль, 61 289 таких хворих померло [1]. Звичайно, ці цифри можуть вказувати на більш ретельну діагностику та більш раннє звернення до лікаря. Проте, як зазначено вище, проблема ранньої, особливо неінвазивної діагностики, потребує нагального вирішення.

На сьогодні основними методами діагностики злоякісних новоутворень є рентгенологічні методи обстеження, що дають змогу виявити пухлину, оцінити її розміри, а також ураження тканин і органів метастазами. Недоліком цього методу є те, що виявити за його допомогою внутрішньопітеліальний або мікроінвазивний рак майже не-

можливо. Як правило, так можна виявити пухлини діаметром 1–2 см (приблизно $1 \cdot 10^9$ клітин), що унеможливує проведення ранньої діагностики і, відповідно, знижує шанси на одужання пацієнта. Різновидом рентгенологічного методу діагностики є томографія — метод пошарового дослідження органів і тканин шляхом впливу на них рентгенівських променів. Комп'ютерна томографія базується на принципі побудови рентгенівського зображення органів і тканин за допомогою комп'ютерних програм [2]. До розповсюджених методів променевої діагностики також належать дослідження з використанням радіонуклідів й ультразвукові дослідження.

У якості одного з основних використовується і більш інвазивний метод діагностики, наприклад, аналіз біопсійного (та/або операційного) матеріалу. Як правило, проводять морфологічний аналіз для встановлення діагнозу за морфологічними ознаками клітин та, у певних випадках, додатковий імуногістохімічний аналіз.

У сучасній клінічній практиці використовують визначення експресії пухлинних маркерів як для уточненої діагностики, так і для прогнозу перебігу захворювання. Використовують як панелі маркерів на основі специфічних антитіл (імуногістохімічний аналіз зразків тканин), так і панелі маркерів для вивчення відносної експресії набору генів

(метод кількісної полімеразної ланцюгової реакції — кПЛР). Обидва методи мають свої переваги та недоліки, які визначають чутливість і специфічність реакцій. Важливо відзначити, що неможливо виділити загальну РНК тільки з пухлинної тканини, тому що в солідних пухлинах наявні клітини стромы, інфільтровані клітини крові тощо. За наявності мікропухлин можлива ситуація, що голка при заборі біопсійного матеріалу пройде поруч зі злоякісним новоутворенням.

Тому велику увагу приділяють розробці неінвазивних чутливих методів ранньої діагностики. Як правило, мішенями для аналізу можуть слугувати позаклітинні нуклеїнові кислоти. Для визначення рівня відносної експресії генів використовують інформаційну РНК (мРНК), яка становить 2–5% від загальної клітинної РНК [3].

Відомо, що прокаріоти і еукаріотичні клітини виділяють РНК у позаклітинний простір, причому РНК може бути як нативною, так і в специфічних мембранних везикулах, таких, як екзосоми (діаметр <150 нм), мікровезикули (200–500 нм), онкосоми (1–10 нм), апоптичні тіла тощо [4, 5]. Звичайно, якщо з клітини виводиться нативна пЗРНК, то внаслідок наявності в позаклітинному середовищі рибонуклеаз вона швидко руйнується.

Важливо відзначити, що до пЗРНК належать різні типи РНК, а саме — мРНК, трансферна РНК (тРНК), мікроРНК (miRNA), мала інтерферуюча РНК (siRNA), а також довга некодуюча РНК (lncRNA). Рибосомна РНК (рРНК) практично не детектувалася як пЗРНК [6].

З усіх субпопуляцій пЗРНК однією з найменш поширених є мРНК, її частка становить <2% [7]. Звичайно, що така мала кількість молекул мРНК є основною проблемою у використанні для вивчення експресії генів. Позаклітинна мРНК може бути виділена з таких біологічних рідин, як кров, сеча, слина або спинномозкова рідина [6–9]. Кількісна оцінка вмісту позаклітинної мРНК вимагає нормалізації рівня їх експресії до специфічного контролю.

Крім того, для вивчення можливості використання певних генів як біомаркерів для захворювань на рак потрібно мати контрольну мРНК з матеріалу умовно здорових донорів.

Метою цієї роботи була розробка методики для вивчення рівня відносної експресії генів на рівні позаклітинної РНК, виділеної із сироватки крові та загальної РНК, отриманої зі зразків пухлинної тканини хворих на рак, а також на рівні білка у тканинах злоякісних новоутворень.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Схему експериментів представлено на рис. 1.

У якості генів — потенційних маркерів нами було вибрано два з родини генів, що кодують мітохондріальні рибосомні протеїни — MRPS18-1 і MRPS18-2 на основі того, що останній є онкопротеїном і бере участь у трансформації клітини, а перший взято

для порівняння. Ці два гени показують більшу гомологію до бактеріального предка, ніж один до одного [10], тому можуть мати різні властивості.

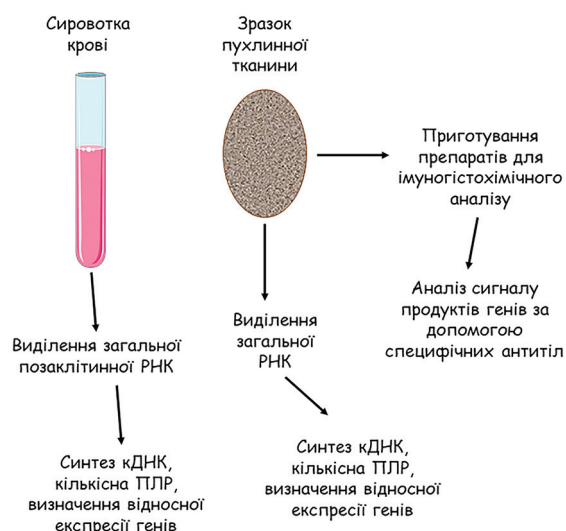


Рис. 1. Схема експериментів з визначення відносної експресії генів на рівні мРНК і кодованих генами продуктів. Із сироватки крові хворих на рак та умовно здорових пацієнтів виділяли загальну пЗРНК. Із зразків тканин виділяли загальну РНК. Після реакції оберненої транскрипції використовували кПЛР для визначення відносної експресії генів. Із зразків тканини готували парафінові секції для імуногістохімічного аналізу сигналу протеїнів

У якості моделі було вибрано гліобластоми головного мозку, оскільки ми мали доступ до сироватки крові та зразків пухлинної тканини, видаленої хірургічно, тобто виділяли загальну РНК з усіх зразків, а також підготували зразки парафінових зрізів пухлинної тканини для розробки методики. Вибрано зразки 4 умовно здорових донорів та 5 пацієнтів, загальна клінічна характеристика яких була представлена раніше [11].

Виділення РНК із сироватки крові та зразків тканин. Загальна РНК була виділена з сироватки крові за допомогою міні-набору RNeasy (Qiagen Inc., Німеччина), згідно з інструкцією виробника. Свіжі зразки тканини заморожували у рідкому азоті одразу після операції та тримали за температури -80°C до використання. Загальну РНК виділяли за допомогою реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific Inc., США), перед використанням TRIzol тканину розтирали в мармуровій ступці після заморожування в рідкому азоті.

Проведення реакції зворотної транскрипції РНК. Із 2 мкг загальної РНК було синтезовано кДНК: dNTP — 10 мМ; OligoDT — 2 мкл; 1 мкл ферменту транскриптази; 1 мкл реагенту Ribolock; 5x Buffer і вода, загальний об'єм — 20 мкл (усі реактиви — Invitrogen, США). Суміш інкубували протягом 60 хв за температури 42°C .

Проведення кПЛР. Реакції кПЛР проводили, використовуючи 2 мкг кДНК та суміш HP FIREPol EvaGreen qPCR (Solis BioDyne, Естонія), за допомо-

гою ПЛР-системи 7500 (Applied Biosystem, США). Для розробки методу вибрали гени *MRPS18-1* (NM_016067) і *MRPS18-2* (NM_014046). Використовували наступні праймери: для *MRPS18-1* — For-5'-CAGGTATCCAGCAATGAGGACC-3', Rev-5'-GCATCCAGTAAATGGAGAAACAAAC3'; для *MRPS18-2* — For-5'-CACAGCGGACTCGGAAGACATG-3', Rev-5'-GCGCAGACAAATTGCTCCAAGAG-3'. У якості внутрішнього контролю для стандартизації було використано ген, що кодує TATA-binding protein (TBP, NM_003194): For-5'-TTTCTTGCCAGTCTGGAC-3', Rev-5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3'. Відносний рівень експресії генів розраховували за допомогою порівняльного методу $\Delta\Delta Ct$. Для кожного гена проводили дві або три реакції (кожну в триплікаті). Умови проведення реакцій наведено в таблиці.

Таблиця

Етапи ПЛР

Етапи	Цикли	Температура, °C	Тривалість етапу
Денатурація	1	95	10 хв
Гібридизація	40	95	45 с
Елонгація		62	45 с
Кінцева елонгація	1	72	10 хв

Проведення імуногістохімічної реакції. Для виявлення протеїнів зразки пухлин було залито у парафін. З метою проведення імуногістохімічної реакції готували зрізи тканини з використанням мікротома товщиною 3–5 мкм, причому зрізи було зафіксовано на обезжиреному предметному скельці (SuperFrost Ultra Plus™ Adhesion Slides, Thermo Scientific, США). Потім проводили депарафінізацію зрізів: препарати прогрівали протягом 10 хв у термостаті за температури 60 °C. Парафін зі зрізів змивали ксилолом (20 хв) і послідовно 96 (20 хв) та 70% (20 хв) етиловим спиртом у воді. Фон прибирали 3% розчином перекису водню у метанолі (10 хв). Для демаскування антигену препарати прогрівали за 95 °C (на водяній бані) в ізоцитратному буфері (4,8 г лимонної кислоти та 7,35 г цитрату натрію на 1 л води, pH≈2–5) протягом 30 хв.

Потім зрізи було охолоджено за кімнатної температури. Неспецифічне зв'язування антитіл блокували спочатку 1% розчином альбуміну із сироватки бика (БСА) протягом 30 хв та наступним інкубуванням із розчином для блокування пероксидази. Використовували систему виявлення EnVision FLEX (Dako, Данія).

Первинні антитіла кроля проти *MRPS18-1* і *MRPS18-2* (розведення 1:200, Cell signaling, США) наносили на препарати та інкубували у вологій камері протягом 60 хв. Вторинне антитіло FLEX/HRP (DAKO) наносили для інкубації на 30 хв. З метою видалення антитіл, які не зв'язалися з антигеном, скельця тричі промивали фосфатним буфером, по 5 хв після кожної інкубації з антитілами. Фермент пероксидазу було візуалізовано за допомогою 3,3'-діамінобензидину, тетрагідрохлориду і перекису

водню. Препарати промивали водою, ядра дофарбовували гематоксиліном Майєра (DAKO), який було використано в якості контрасту протягом 10 хв, потім проводили обробку 30, 70, 96% водним розчином етанолу, далі — ксилолом, після чого закривали покривними скельцями на канадському бальзамі. Реакцію вважали позитивною у разі виявлення сигналу коричневого кольору в місцях локалізації антигену за допомогою світлового мікроскопа. Кожний зразок було оцінено в індивідуальному порядку. Реакцію оцінювали як негативну (якщо не спостерігалося позитивних клітин), слабку (+), помірну (++) і сильну (+++).

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою програми GraphPadPrism9. Для кожного гена проводили *t*-тест (за критерієм Ст'юдента) та тест Манна — Уїтні (за непараметричними критеріями для груп). Формували по дві групи для кожного гена: за відносною експресією генів на рівні мРНК у пухлинній тканині і в сироватці крові хворих. Статистично достовірно вважали різницю між показниками груп за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті експериментального визначення відносної експресії генів *MRPS18-1* і *MRPS18-2* у пухлинній тканині та в сироватці крові хворих було показано, що ці гени експресуються у зразках пухлинних тканин на вищому рівні, ніж у сироватці крові (рис. 2).

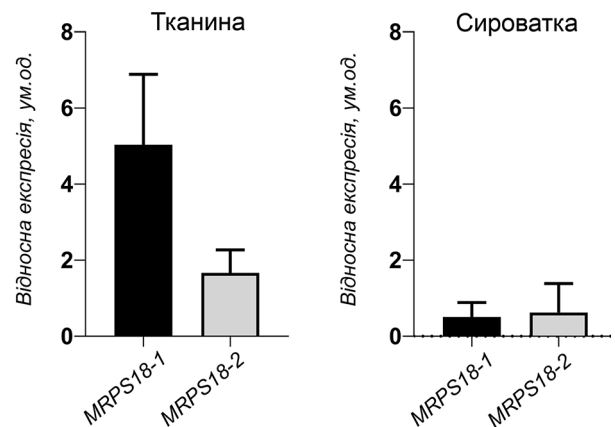


Рис. 2. Відносна експресія генів в умовних одиницях, нормалізована за рівнем експресії гена *TBP*, яка була визначена методом кПЛР. Із сироватки крові хворих на рак виділяли загальну пЗРНК. Із зразків тканин пухлини виділяли загальну РНК

Як видно з рис. 2, у пухлинних тканинах (середнє значення) відносна експресія генів була вищою, ніж у сироватці крові, причому для гена *MRPS18-1* різниця була майже у 5 разів, а для гена *MRPS18-2* — набагато меншою, не більше, ніж у 2 рази. Цей факт можна пояснити різним призначенням продуктів цих двох генів, а також знаходженням протеїнів не тільки в мітохондріальних рибосомах, а і в інших компартментах клітини для виконання своїх функцій.

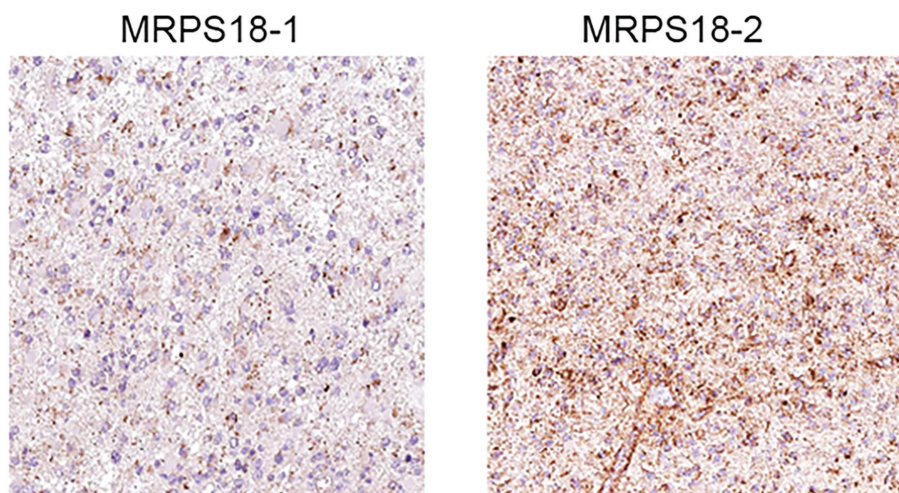


Рис. 3. Патерн експресії протеїнів, визначених за допомогою специфічних антитіл, у зразках низько-диференційованих гліом головного мозку

Як ми зазначили раніше, кількість позаклітинної мРНК є меншою у порівнянні зі звичайною клітинною мРНК [7]. Більше того, стабільність пЗРНК визначається не тільки знаходженням у мембранних везикулах, а також взаємодією з протеїнами і ліпідами [6]. Тобто пЗРНК демонструє різну стабільність, що впливає на швидкість її деградації.

Експресія двох вищевказаних генів у сироватці здорових донорів була нижчою за рівень можливої детекції методом кПЛР. Тому дані (нулі) не показано на діаграмах.

Важливо відмітити, що ген *MRPS18-2* експресується на схожих рівнях у пухлинній тканині і у сироватці крові хворих, що вказує на його потенційне значення як пухлинного молекулярного маркера.

Потенціал пЗРНК якості біомаркерів значний, особливо внаслідок розвитку секвенування наступного покоління (new generation sequencing), яке забезпечує визначення профілю експресії з високою пропускну здатністю [12, 13].

Звичайно, одною із численних форм пЗРНК, яка широко використовується наразі, є мікроРНК (miRNA). Так, під час діагностування дифузної крупноклітинної В-клітинної лімфоми висока експресія miR-21 була пов'язана з виживанням без рецидивів; рівні miR-141 в сироватці крові дозволяють відрізнити пацієнтів з раком передміхурової залози від здорових осіб контрольної групи; miR-17-3p і miR-92 були значно підвищені у пацієнтів із колоректальним раком, а після хірургічного втручання рівень цих miRNA знижувався в сироватці крові, тощо [4, 7, 9].

Більше того, позаклітинна miRNA відіграє роль у передачі сигналів між клітинами імунної системи [14]. Наразі показано у багатьох лабораторіях, що перенесення пЗРНК може призводити до змін у профілі експресії генів у клітині-реципієнті [15]. Нещодавно було встановлено, що навіть позаклітинна мРНК може переноситися до ядра клітини-реципієнта за рахунок білок-білкових взаємодій, причо-

му зміни у патерні експресії у клітині-хазяїні можуть призводити до різних наслідків, навіть до загибелі такої клітини [16].

Звичайно, було важливо визначити сигнали продуктів вищевказаних генів у пухлинних тканинах. У нас не було можливості отримати зразки нормальної тканини головного мозку, проте можна було порівняти патерн експресії двох протеїнів (рис. 3).

Як видно, антитіла проти *MRPS18-2* давали сильний цитоплазматичний сигнал майже в усіх пухлинних клітинах, іноді спостерігався сигнал в ядрах. У той же час сигнал протеїну *MRPS18-1* детектували лише в цитоплазмі, і не в усіх пухлинних клітинах.

ВИСНОВКИ

Отримані нами дані показують принципову можливість виділення достатньої для детекції методом кПЛР кількості позаклітинної мРНК із сироватки крові хворих на рак. Також показано, що для гена *MRPS18-2* існує суттєва різниця в рівнях позаклітинної мРНК у пацієнтів з гліомами головного мозку та умовно здоровими донорами. Експресія гена *MRPS18-2* на рівні мРНК не суттєво відрізняється в сироватці крові і в пухлинній тканині, що робить ген *MRPS18-2* потенційним маркером пухлинного процесу.

Звичайно, крім даного пілотного дослідження, слід провести роботу з використанням матеріалів більшої кількості пацієнтів, а також на зразках хворих з іншими нозологічними формами, такими як рак передміхурової та молочної залози з метою розробки панелі неінвазивних молекулярних маркерів діагностики або прогнозу перебігу онкологічних захворювань.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної

біології Національної академії наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedorenko Z, Michailovich Yu., Goulak L., *et al.* CANCER IN UKRAINE 2019-2020: Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. Kyiv: National Cancer Registry of Ukraine (NCRU). 2021. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_22/index_e.htm
2. Mishra S, Sharma S, Javed MN, *et al.* Bioinspired nanocomposites: applications in disease diagnosis and treatment. *Pharm Nanotechnol* 2019; **7** (3): 206–19.
3. Gubsky YI. Biological chemistry. Kyiv-Ternopil: Ukrmedknyha 2000. 508 p. (in Ukrainian)
4. Di Vizio D, Morello M, Dudley AC, *et al.* Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *Am J Pathol* 2012; **181** (5): 1573–84.
5. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* 2015; **40**: 41–51.
6. Sadik N, Cruz L, Gurtner A, *et al.* Extracellular RNAs: a new awareness of old perspectives. *Methods Mol Biol* 2018; **1740**: 1–15.
7. Yuan T, Huang X, Woodcock M, *et al.* Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Sci Rep* 2016; **6**: 19413.
8. Savelyeva AV, Kuligina EV, Bariakin DN, *et al.* Variety of RNAs in peripheral blood cells, plasma, and plasma fractions. *Biomed Res Int* 2017; **2017**: 7404912.
9. Jung YW, Shim JI, Shim SH, *et al.* Global gene expression analysis of cell-free RNA in amniotic fluid from women destined to develop preeclampsia. *Medicine (Baltimore)* 2019; **98** (3): e13971.
10. Mushtaq M, Ali RH, Kashuba V, *et al.* S18 family of mitochondrial ribosomal proteins: evolutionary history and Gly132 polymorphism in colon carcinoma. *Oncotarget* 2016; **7** (34): 55649–62.
11. Kovalevska LM, Malysheva TA, Kalman SS, *et al.* Expression pattern of MRPS18 family genes in gliomas. *Exp Oncol* 2021; **43** (3): 204–8.
12. Larson MH, Pan W, Kim HJ, *et al.* A comprehensive characterization of the cell-free transcriptome reveals tissue- and subtype-specific biomarkers for cancer detection. *Nat Commun* 2021; **12** (1): 2357.
13. Moufarrej MN, Wong RJ, Shaw GM, *et al.* Investigating pregnancy and its complications using circulating cell-free rna in women's blood during gestation. *Front Pediatr* 2020; **8**: 605219.
14. de Candia P, De Rosa V, Casiraghi M, Matarese G. Extracellular RNAs: a secret arm of immune system regulation. *J Biol Chem* 2016; **291** (14): 7221–8.
15. O'Brien K, Breynne K, Ughetto S, *et al.* RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; **21** (10): 585–606.
16. Tomita T, Kato M, Mishima T, *et al.* Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function. *Nat Commun* 2021; **12** (1): 3655.

STUDY ON RELATIVE GENE EXPRESSION LEVELS IN TUMOR TISSUE AND IN BLOOD SERUM OF CANCER PATIENTS

L.M. Kovalevska¹, T.V. Zadvornyy¹, T.A. Malysheva², S.S. Kalman¹, N.Yu. Lukianova¹, E.V. Kashuba¹

¹R.E. Kavetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²The State Institution Romodanov Neurosurgery Institute of NAMSU, Kyiv, Ukraine

Summary. Aim: to develop a method to assess relative gene expression at a level of extracellular RNA (exRNA) isolated from blood serum and total RNA obtained from tumor tissue samples, as well as at the protein level in malignant neoplasms. **Object and methods:** samples of blood serum and surgical material of 5 patients with brain glioblastomas and blood sera of 4 healthy donors. MRPS18-1 and MRPS18-2 proteins were determined by immunohistochemistry. Statistical analysis was performed, using GraphPad-Prism9. **Results:** the MRPS18-2 gene shows a significant difference in extracellular mRNA levels in patients with brain gliomas and healthy donors. The expression of the MRPS18-2 gene at the mRNA level is not much different in blood serum and tumor tissue, that makes the MRPS18-2 gene a putative tumor marker. **Conclusions:** our data show the possibility of isolating a sufficient amount of extracellular mRNA from the blood serum of cancer patients for detection by qPCR. In addition to this pilot study, more patients, as well as samples from patients with various nosological forms, such as prostate and breast cancer, should be studied, to develop a panel of non-invasive molecular markers for cancer diagnosis and/or prognosis.

Key Words: malignant neoplasms, gene expression, blood serum, tumor tissue, quantitative PCR, extracellular RNA.

Адреса для листування:

Кашуба О.В.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: Kashuba@nas.gov.ua, lenakash@yahoo.com

Одержано: 12.10.2021