

О.В. Булгакова, Р.И. Берсимбаев

## СВОБОДНО-ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МИКРОРНК КАК БИОМАРКЕР РАКА ЛЕГКОГО

### FREE-CIRCULATING MICRORNA IN BLOOD PLASMA AS A BIOMARKER OF LUNG CANCER.

Свободно циркулирующие в плазме крови микроРНК (miR) привлекают к себе все большее внимание в качестве потенциальных неинвазивных диагностических маркеров в онкологии. Рак легкого занимает лидирующие позиции в структуре онкопатологий по всему миру, включая Казахстан. Данное заболевание трудно поддается диагностированию на ранних стадиях опухолевого процесса. Сравнительный анализ содержания свободно циркулирующих микроРНК в плазме крови больных раком легкого показал, что уже на ранних стадиях развития рака происходит повышение уровня экспрессии miR125b-5p и miR-155-5p. Метод диагностики рака легкого с использованием данных микроРНК характеризуется высокой чувствительностью и может применяться в практической медицине.

Ключевые слова: микроРНК, miR155-5p, miR125b-5p, рак легкого, биомаркер.

Free-circulating microRNAs (miR) in blood plasma have received an increasing amount of interest as potential non-invasive diagnostic tools in oncology. Lung cancer occupies a leading position in the structure of cancer worldwide, including Kazakhstan. This disease is difficult to diagnose at the early stages of the tumor process. A comparative analysis of free circulating microRNA in the blood plasma of lung cancer patients showed that already at the early stages of cancer there is an increase in the expression level of miR125b-5p and miR-155-5p. The method of lung cancer diagnosing using these microRNAs is characterized by high sensitivity and can be used in practical medicine.

Keywords: microRNA, miR155-5p, miR125b-5p, lung cancer, biomarker.

ЕНУ имени Гумилева, Астана, Казахстан.

**Р**ак легкого (РЛ) занимает доминирующие позиции в структуре онкологических заболеваний по частоте распространения и смертности во многих странах, в том числе и в Республике Казахстан [1].

Ранние признаки развития новообразований в легких не специфичны и совпадают с общеклиническими симптомами других заболеваний органов дыхания [2]. Поэтому диагностика рака легкого на ранних этапах довольно затруднительна. Следовательно, необходимы новые методы диагностики данного заболевания, которые позволят выявлять РЛ на самых ранних стадиях развития.

МикроРНК являются тканеспецифичными молекулами и играют важную роль в процессах развития и дифференцировки тканей и органов. Недавние исследования показали, что при различных заболеваниях, в том числе онкологических, происходит изменение уровня экспрессии микроРНК [3]. Это позволяет предположить, что свободно циркулирующие молекулы микроРНК, выделенные из биологических жидкостей организма, могут использоваться в качестве биомаркеров для диагностики РЛ.

Материалом для исследования являлась микроРНК, выделенная из плазмы крови пациентов с диагнозом рак легкого и здоровых людей. В первую группу – «рак легкого» вошли 86 пациентов, находящихся на учете в Акмолинском областном онкологическом диспансере г. Кокшетау, и в Онкологическом диспансере г. Астана. Контрольную группу представили 50 человек без патологии легких.

Выделение микроРНК осуществлялось набором miRCURY RNA Isolation kit (#300112, Exiqon). Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью ThermoScientificNanoDrop 1000 Spectrophotometer.

ПЦР в режиме реального времени проводили в амплификаторе CFX96 ToUch™ (Bio-Rad) с использованием Мастер Микс – miRCURY LNA™ microRNA PCR, ExiLENT SYBR® Green master mix, 2.5 ml hsa-miR-125-5p (#205713, Exiqon), hsa-miR-155-5p (#204308, Exiqon) согласно протоколу производителя. В качестве эндогенного контроля использовали RNU6 (#203907, Exiqon).

Количественное определение экспрессии микроРНК осуществлялось с использованием метода относительных определений количественных значений  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [4].

Данные анализировали однонаправленным ANOVA с множественным сравнительным тестом с использованием программы GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, США). Значения  $P < 0,05$  считались значимыми (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

Было установлено увеличение относительного уровня экспрессии miR125b-5p у пациентов группы «Рак легкого» в 4,3 раза по сравнению с контрольной группой здоровых лиц ( $p < 0,001$ ) (табл. 1).

Относительный уровень экспрессии miR125b-5p у больных раком легкого в сравнении с контролем Таблица 1

	miR125b-5p	U6	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Разница в уровне экспрессии miR125b-5p у больных РЛ
Контроль	34,1±0,4	32,2±0,6	1,98±0,8	0,00±0,8	1(0,58–1,72)
Рак легкого	32,1±0,4	32,2±0,5	(-0,134)±0,7	(-2,11)±0,7	4,3(2,7–4,8)

Исходя из данных, приведенных в таблице 2, в группе пациентов «Рак легкого» уровень miR-155-5p был в 2,84 раза выше по сравнению с контрольной группой здоровых лиц ( $p < 0,01$ ).

Относительный уровень экспрессии miR-155-5p у больных раком легкого в сравнении с контролем Таблица 2

	miR-155-5p	U6	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	Разница в уровне экспрессии miR-155-5p у больных РЛ
Контроль	34,7±0,6	31,9±0,5	2,7±0,8	0,00±0,8	1(0,56–1,8)
Рак легкого	33,1±0,4	31,9±0,5	1,2±0,7	(-1,5)±0,7	2,8 (1,71–4,8)

Таким образом, достоверная разница между уровнем экспрессии в группах больных раком легкого и здоровых людей, показывает, что miR125b-5p и miR-155-5p являются онкомирами, ассоциированными с развитием РЛ. Следовательно, данные микроРНК играют ключевую роль в патогенезе злокачественных неоплазий легкого и могут рассматриваться как онкомаркеры в диагностике рака легкого.

Оценка чувствительности диагностического метода [5], основанного на определении уровня miR125b-5p и miR-155-5p в плазме крови пациентов, показала, что данная система маркеров характеризуется достаточно высокой чувствительностью.

Так, при использовании miR125b-5p в качестве биомаркера диагноз был подтвержден у 79 из 86 пациентов, что соответствует 92 % случаев. При использовании miR-155-5p в качестве онкомаркера чувствительность метода составила 78 %, т.к. диагноз был подтвержден у 67 из 86 пациентов.

Таким образом, выявление повышенного уровня свободно-циркулирующих в плазме крови человека miR125b-5p и miR-155-5p может служить диагностическим признаком рака легкого.

#### Литература

1. Bersimbaev R., Bulgakova O. Residential radon exposure and lung cancer risk in Kazakhstan // Radon / ed. F. Adrovic. London, 2017. P. 93–124.
2. Amin J., Sharif M., Yasmin. M. Segmentation and classification of lung cancer: a review // Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry. 2016. Vol. 16 (2):82. P. 99.
3. Izzotti A., Carozzo S., Pulliero A., Zhabayeva D., Ravetti J.L., Bersimbaev R. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention. // Am J Cancer Res. 2016. Vol. 6(7). P. 1461–1493.
4. Livak, Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta Ct$  method // Methods. 2001. Vol. 25. P. 402–408.
5. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред. А.И. Карпищенко. 2012.