

УДК 577.2:616-006

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ мРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ ГЕНОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ, НА РАННИХ СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2012 г. Д. В. Новиков<sup>1\*</sup>, Т. В. Белова<sup>1</sup>, Е. С. Плеханова<sup>1</sup>, О. С. Янченко<sup>2</sup>, В. В. Новиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и региональной экологии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, 603000

Поступила в редакцию 23.12.2011 г.

Принята к печати 15.02.2012 г.

мРНК ряда раково-тестикулярных генов служат биомаркерами раковых клеток, мигрирующих по кровяному руслу. Нами проведено сравнение частоты обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов *MAGEA1-6*, *GAGE1-8*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2, и 4, *XAGE1* и *MAGE-C1* в образцах опухолевых очагов (39) и периферической крови (64) больных колоректальным раком методом ОТ-ПЦР. В образцах опухолевых очагов мРНК хотя бы одного гена обнаруживается в 95% (37/39) случаев, тогда как в периферической крови – в 81% (52/64) случаев. Соответствующие мРНК детектировались в клеточной фракции периферической крови больных колоректальным раком на всех стадиях заболевания (в 14 из 14 случаев), тогда как во фракции внеклеточных нуклеиновых кислот плазмы обнаруживались только на стадиях III и IV. Наши данные указывают на возможность ранней диагностики колоректального рака в группах пациентов высокого риска с использованием периферической крови.

**Ключевые слова:** мРНК раково-тестикулярных генов, ОТ-ПЦР, колоректальный рак, циркулирующие раковые клетки.

EARLY DETECTION OF CANCER/TESTIS mRNAs IN TUMOR CELLS CIRCULATING IN THE PERIPHERAL BLOOD OF COLORECTAL CANCER PATIENTS, by D. V. Novikov<sup>1\*</sup>, T. V. Belova<sup>1</sup>, E. S. Plekhanova<sup>1</sup>, O. S. Yanchenko<sup>2</sup>, V. V. Novikov<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Regional Ecology, Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhni Novgorod, 603950 Russia, \*e-mail: mbre@mail.ru; <sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhni Novgorod, 603000). Recent studies have suggested that mRNAs transcribed from cancer/testis genes might be used as biomarkers of cancer cells migrating through the bloodstream. Using RT-PCR we evaluated the expression of several cancer/testis mRNAs (*MAGEA1-6*, *GAGE1-8*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2, and 4, *XAGE1* and *MAGEC1*) in primary tumors and peripheral blood samples of colorectal cancer patients. The detection rate of at least one of the transcripts was 95% (37/39 samples) for primary tumors and 81% (52/64 samples) for the peripheral blood. Moreover, selected mRNAs were detectable in cellular fraction of the peripheral blood at all stages the disease (14 out of 14 cases), whereas in extracellular fraction of plasma were found only at stages III and IV. Obtained data open a possibility of early diagnosis of colorectal cancer in people at high risk by peripheral blood analysis.

**Keywords:** cancer/testis mRNA, RT-PCR, colorectal cancer, circulating cancer cells.

Процесс образования метастазов включает перемещение с током крови раковых клеток от первичной опухоли в отдаленные органы [1]. Исследования показали присутствие циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови больных онкологическими заболеваниями. В настоящее время обсуждается, каким образом наличие в

периферической крови циркулирующих опухолевых клеток может быть использовано в прогностических и мониторинговых целях. Основной проблемой является низкая частота обнаружения циркулирующих опухолевых клеток, вызванная применением методов, основанных на использовании недостаточно специфичных онкомаркеров [2].

\* Эл. почта: dv\_novikov@yahoo.com

Известна группа раково-тестикулярных (СТ – от английского cancer/testis) генов, характеризующаяся ограниченной экспрессией в клетках человека. В группу СТ-генов отнесены около 70 семейств генов, большинство из которых расположены на X-хромосоме в виде мультигенных семейств [3]. СТ-гены транскрибируются в семенниках, клетках зародыша и плаценты, иногда в клетках иммунопривилегированных тканей. В остальных клетках экспрессия СТ-генов подавлена эпигенетически. Функции большинства СТ-белков не известны, однако установлена принадлежность некоторых белков к группе транскрипционных факторов [4]. В зародышевых клетках экспрессия СТ-генов ассоциирована с клетками, обладающими высокой пролиферативной активностью [5]. При трансформации клетки в опухолевую наблюдается активация экспрессии СТ-генов, что связано с метилированием хромосомной ДНК [6]. Исследования содержания мРНК СТ-генов в клетках различных типов опухолей указывают на случайный характер активации. Клетки опухоли, сходные по гистологическому типу и локализации, могут иметь отличающиеся наборы активных СТ-генов, а опухоли, имеющие разное тканевое происхождение, могут обладать сходным набором раково-тестикулярных мРНК. Предполагается, что экспрессия СТ-генов связана с приобретением опухолевыми клетками таких свойств, как способность к активной пролиферации и миграции в отдаленные органы и ткани [3].

Хотя экспрессия СТ-генов незначительна, ее уровень достаточен, чтобы использовать их мРНК в качестве маркеров опухолевых клеток при различных онкологических заболеваниях. Показано, что мРНК СТ-генов обнаруживаются не только в клетках опухолевых очагов, но и в периферической крови больных. Однако остается не ясным, отражением какого процесса является обнаружение мРНК СТ-генов в периферической крови. В общем, это следствие значительных изменений в программе дифференцировки в результате реорганизации структуры хроматина и системы регуляции транскрипции кодирующих и некодирующих РНК. Конкретные процессы, обуславливающие изменения в экспрессии большинства генов не ясны. Предполагается, что присутствие мРНК СТ-генов в периферической крови свидетельствует о наличии циркулирующих опухолевых клеток [7]. С другой стороны, известно, что в периферической крови обнаруживаются внеклеточные нуклеиновые кислоты, в том числе мРНК, находящаяся в составе нуклеопротеидных комплексов разной природы [8]. Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что присутствие мРНК СТ-генов в периферической крови больных колоректальным раком на ранних стадиях заболевания

является показателем циркуляции опухолевых клеток.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**В работе использовали** следующие нуклеотидные последовательности mRNA, зарегистрированные и обозначенные в базе данных GenBank: *Homo sapiens* (далее *Hs*) G antigen 1 (GAGE1), NM\_001468; *Hs* G antigen 2 (GAGE2), NM\_001472; *Hs* G antigen 3 (GAGE3), NM\_001473; *Hs* G antigen 4 (GAGE4), NM\_001474; *Hs* G antigen 5 (GAGE5), NM\_001475; *Hs* G antigen 6 (GAGE6), NM\_001476; *Hs* G antigen 7 (GAGE7), NM\_021123; *Hs* G antigen 8 (GAGE8), NM\_012196; *Hs* G antigen, family D, 2 (XAGE1), NM\_020411; *Hs* autoimmunogenic cancer/testis antigen NY-ESO-1, U87459; *Hs* melanoma antigen family C, 1 (MAGEC1), NM\_005462 и XM\_936930; *Hs* synovial sarcoma, X breakpoint 1 (SSX1), NM\_005635 XM; *Hs* synovial sarcoma, X breakpoint 2 (SSX2), transcript variant 1, NM\_003147; *Hs* synovial sarcoma, X breakpoint 4 (SSX4), transcript variant 1, NM\_005636; *Hs* melanoma antigen family A, 1 (MAGEA1), NM\_004988; *Hs* melanoma antigen family A, 2 (MAGEA2), NM\_153488; *Hs* melanoma antigen family A, 3 (MAGEA3), NM\_005362; *Hs* melanoma antigen family A, 4 (MAGEA4), NM\_001011548; *Hs* melanoma antigen family A, 5 (MAGEA5), NM\_021049; *Hs* melanoma antigen family A, 6 (MAGEA6), NM\_005363. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием ресурсов, доступных в интернет на портале NCBI, и компьютерной программы MEGA3.1.

**Исследовали образцы** периферической крови больных колоректальным раком, взятой до хирургического вмешательства, и образцы из опухолевых очагов после резекции опухоли у тех же больных. Все образцы получены от больных, проходивших лечение в Нижегородском областном онкологическом центре. В качестве отрицательного контроля использовали периферическую кровь 20 добровольцев. Для разрушения клеток и предотвращения деградации мРНК все тестируемые образцы помещали в равный объем лизирующего буфера, содержащего 4M гуанидинтиоцианат, 0.5% Тритона-X-100 и 25 mM ацетат натрия, pH 7.0.

**Выделяли нуклеиновые кислоты** из 200 мкл исследуемых образцов, используя метод депротенинизации смесью фенола и хлороформа с последующей преципитацией этанолом [9]. Затем проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы M-MuLV (“Fermentas EC”), согласно рекомендациям производителя. В качестве затравки применяли смесь олигонуклеотидов, специфичных для мРНК MAGEA1-6, GAGE1-9, NY-ESO-1, SSX1, 2 и 4, XAGE1 и MAGEC1, обозначенных R1 (табл. 1). Получен-

**Таблица 1.** Характеристика праймеров, используемых для обнаружения мРНК СТ-генов методом ОТ-ПЦР

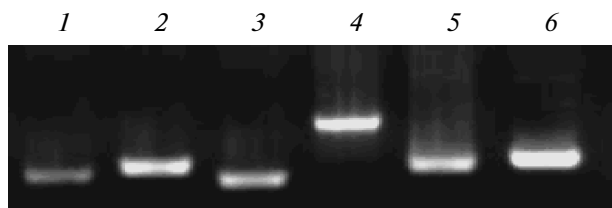
мРНК	Этап ПЦР	Название	Первичная структура (5'- 3')	Размер кДНК (п.н.)
MAGEA1-6	I	MMRP1 [10]	ACTGAAGGAGAAGATCTGCC	375
		MAR1	GTGCTTGGCCCCCTCCTTTC	
	II	MAF2	AGGAGAAGATCTGCCWGTGG	265
		MAR2	CTGGAGGCTCCCTGAGGACT	
SSX1, 2, 4	I	SSXF1	GAGAAGTTCGAAAGGCCTT	289
		SSXR1	TTCTTGGGCATGATCTTCGGG	
	II	SSXF2	AGGTTATGACTAAACTAGGT	129
		SSXR2	AAGTCATCTGAGGACGTTCA	
XAGE1	I	X-F1	CTACTGAGACACGGCGGACA	329
		X-R1	TTGTTTCAGCTTGTCTTCAT	
	II	X-F2	ATACAGCTGAGATCCCAGTG	162
		X-R2	TTGTGGTTGCTCTTCACCTG	
MAGEC1	I	C-F1	CCTATCCAGTCTTCAAGGTG	297
		C-R1	CAGGACAACCTCTGAGGACTC	
	II	C-F2	AGTGCCAGGAGTCAAGGTTC	138
		C-R2	GCATATCCTTGTCCCCCATG	
NY-ESO-1	I	NYF1	AGAGCCGCCTGCTTGAGTTC	172
		NYR1	TCTGCAGCAGTCAGTCGGAT	
	II	NYF2	CCTGCTTGAGTTCTACCTCG	159
		NYR2	GCAGTCAGTCGGATAGTCAG	
GAGE1-8	I	G-F1	ATTGGGCCTATGCGGCCCGA	321
		G-R1	TCCAACAYAGGAGCAGCCTG	
	II	G-F2	AGCATCTGCAGSTCAAGGGC	170
		G-R2	TCTTTTAACACTGTGATTGC	

ные образцы кДНК амплифицировали, используя метод ПЦР в два раунда для раздельного выявления мРНК каждого из (шести семейств) исследуемых генов (табл. 1). В реакционной смеси содержалось 85 мМ ацетат калия, 25 мМ трицин, рН 8.7, 8% глицерина, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0.2 мМ каждого из dNTP, по 10 пикомоль праймеров R и F, 5 мкл ДНК и 5 е.а. Taq-полимеразы. Для каждой из исследуемых мРНК проводили 35 циклов первой и 25 циклов второй ПЦР при следующих условиях: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с.

**Результаты (ОТ-ПЦР) регистрировали** методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Для подтверждения идентичности амплифицированные фрагменты кДНК выделяли из геля с использованием набора “DNA Extraction Kit” (“Fermentas” ЕС). Очищенную кДНК секвенировали, используя набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”) на приборе ABI Prism 3130 (США), согласно рекомендациям производителей.

Определенные нами нуклеотидные последовательности сравнивали с представленными в базе данных GenBank, затем кДНК использовали в дальнейшей работе в качестве маркеров размерности (рис. 1).

**Разделение периферической крови** больных колоректальным раком на фракции внеклеточных нуклеиновых кислот проводили, как описано ранее [11]. Образцы периферической крови разделяли центрифугированием на плазму и форменные элементы. Для элюции внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью клеток крови через ионные взаимодействия, к суспензии клеток добавляли буфер, содержащий 15 мМ EDTA и 0.9% NaCl, центрифугировали и отбирали надосадочную жидкость. Для протеолитического отщепления нуклеопротеидных комплексов к полученному осадку клеток добавляли равный объем 0.125% трипсина, инкубировали в течение 1 мин при помешивании, добавляли ин-



**Рис. 1.** Результаты обнаружения мРНК раково-тестикулярных генов в образце опухолевого очага больного раком толстого кишечника методом ОТ-ПЦР (электрофорезграмма). 1 – мРНК *MAGEC1* (138 п.н.); 2 – мРНК *NY-ESO-1* (159 п.н.); 3 – мРНК *SSX1,2,4* (129 п.н.); 4 – мРНК *MAGEA1-6* (265 п.н.); 5 – мРНК *XAGE1* (162 п.н.); 6 – мРНК *GAGE1-8* (170 п.н.).

гибитор сериновых протеаз PMSF до концентрации 5 мМ и разделяли фракции центрифугированием. К полученным таким образом фракциям добавляли равный объем лизирующего буфера и тестировали на присутствие мРНК СТ-генов или хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

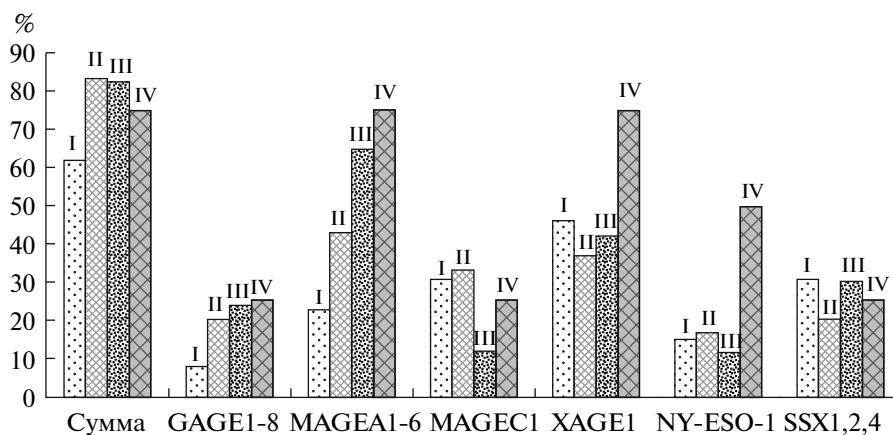
На основе анализа данных литературы были выбраны СТ-гены, “молчащие” в клетках периферической крови человека (*MAGEA1-6*, *GAGE1-8*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2 и 4, *XAGE1* и *MAGEC1*) [12]. Для мРНК каждого из исследуемых генов подбирали праймеры, специфичные к местам присоединения экзонов, что позволяет предотвратить амплификацию хромосомной ДНК при проведении ПЦР. Для семейств генов *MAGEA*, *GAGE*, *SSX* конструировали универсальные праймеры, позволяющие одновременно детектировать мРНК шести генов *MAGEA* (*MAGEA1-6*), а также универсальные праймеры для мРНК восьми генов *GAGE* (*GAGE1-8*) и праймеры, специфичные одновременно к мРНК трех генов *SSX* (*SSX1*, 2 и 4). Эти

праймеры использовали для обнаружения мРНК исследуемых генов методом ОТ-ПЦР в образцах периферической крови и опухолевых очагов

На рис. 1 представлены фрагменты кДНК, у которых была определена первичная структура и установлена их принадлежность к искомым кДНК, что позволило использовать их в дальнейшей работе как маркеры длины. Установлено, что в образцах периферической крови двадцати волонтеров, не страдающих онкологическими заболеваниями, мРНК *MAGEA1-6*, *GAGE1-8*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2 и 4, *XAGE1* и *MAGEC1* обнаружено не было. В то же время в образцах опухолевых очагов больных колоректальным раком мРНК хотя бы одного гена обнаружена в 95% (37 из 39) случаев. При исследовании периферической крови 64 пациентов, больных колоректальным раком, мРНК СТ-генов обнаружена у 52 человек (81%).

На рис. 2 представлены результаты сравнения частот появления мРНК *MAGEA1-6*, *GAGE1-8*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2 и 4, *XAGE1* и *MAGEC1* в периферической крови больных на разных стадиях колоректального рака. На стадии I суммарная частота обнаружения мРНК всех исследуемых генов составила 62% (9 из 13), на II – 83% (25 из 30 образцов), на III – 82% (14 из 17), на IV – 75% (3 из 4). Интересно отметить, что на первой стадии заболевания колоректальным раком чаще других (см. рис. 2) обнаруживается мРНК *XAGE1* (46%). На последующих стадиях наиболее часто обнаруживается мРНК шести генов семейства *MAGEA* (50–75%).

Далее сравнивали результаты по обнаружению мРНК СТ-генов в образцах опухоли и периферической крови 39 больных колоректальным раком. У двух больных мРНК СТ-генов не детектируется ни в опухолевых очагах, ни в периферической крови. В 37 образцах опухолевых очагов обнаружено от трех до шести наименований семейств исследуемых мРНК, а в образцах перифериче-



**Рис. 2.** Частота обнаружения мРНК СТ-генов в периферической крови больных колоректальным раком на стадиях I–IV заболевания.

ской крови тех же больных — от одного до трех (из шести проанализированных семейств). В подавляющем большинстве случаев мРНК СТ-генов, выявленная в периферической крови, присутствует в опухолевом очаге. В периферической крови двух больных имеются мРНК, которые не детектируются в образцах опухоли. В первом случае, на стадии II заболевания, в периферической крови найдены мРНК семейства генов *GAGE*, транскрипции которых не происходит в опухолевом очаге. Во втором случае, на стадии III заболевания, обнаружена мРНК семейства генов *MAGEA*, которой не найдено в клетках опухоли.

Для поисков источника происхождения мРНК СТ-генов в периферической крови больных колоректальным раком использовали образцы крови 14 больных. В этих образцах предварительно была обнаружена мРНК *MAGE-C1*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2 и 4 и *XAGE1*. Периферическую кровь фракционировали приведенным ниже способом. На первом этапе низкоскоростным центрифугированием отделяли форменные элементы от плазмы крови. Затем, путем обработки форменных элементов крови растворами EDTA с увеличивающимися концентрациями, проводили десорбцию внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью клеток за счет ионных взаимодействий. На последнем этапе клетки обрабатывали трипсином для получения фракции внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностью клеток за счет взаимодействий с белками, и фракции клеток, свободных от внеклеточных (сорбированных на поверхности) нуклеиновых кислот. Результаты обнаружения мРНК СТ-генов в полученных фракциях представлены в табл. 2.

В стабилизированной антикоагулянтом плазме крови мРНК СТ-генов найдена только у одного больного (мРНК *NY-ESO-1*, см. табл. 2), у которого был обнаружен колоректальный рак IV стадии. В остальных случаях мРНК СТ-генов в плазме крови не определялась. Во фракциях периферической крови, содержащих внеклеточные

нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью клеток за счет ионных взаимодействий (EDTA-элюат), у пяти больных обнаружили мРНК семейства генов *SSX* и мРНК гена *NY-ESO-1*; при этом трое из больных имели стадию III заболевания, а двое IV. Во фракции внеклеточных нуклеиновых кислот, связанных с поверхностными белками клеток крови (трипсиновый элюат), у четырех больных обнаруживались мРНК *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2, и 4 и *MAGE-C1*. Эти же мРНК найдены у двух больных на стадии III колоректального рака и у двух на IV. В клетках крови, с поверхности которых были удалены внеклеточные нуклеиновые кислоты (клетки после десорбции), мРНК СТ-генов обнаруживалась на всех четырех стадиях заболевания. Таким образом, в клетках, циркулирующих в кровотоке, мРНК СТ-генов обнаруживается на всех четырех стадиях заболевания, тогда как во фракциях, содержащих внеклеточные нуклеиновые кислоты, только на стадии III и IV.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение мРНК СТ-генов в образцах периферической крови больных колоректальным раком свидетельствуют о циркуляции в кровяном русле клеток, несущих маркеры опухолевых клеток. При фракционировании периферической крови больных колоректальным раком нами показано, что на всех стадиях заболевания мРНК СТ-генов связана с клеточной фракцией крови, свободной от внеклеточных нуклеиновых кислот. У пациентов с III и IV стадиями заболевания мРНК исследуемых генов выявляется и во фракциях периферической крови, соответствующих внеклеточным нуклеиновым кислотам, которые связаны с поверхностью форменных элементов крови. В плазме крови матричная РНК СТ-генов обнаружена только на стадии IV колоректального рака.

Представления об образовании отдаленных метастазов при развитии солидных опухолей базируются на том, что опухолевые клетки могут циркулировать в кровяном русле. При развитии опухоли многие раковые клетки приобретают способность к инвазии в прилегающие ткани и миграции по кровеносным сосудам и с током крови разносятся по всему организму. Подавляющее большинство из них погибает, лишь единицы приобретают способность к закреплению в новом месте локализации. Закрепившись, одни из них дают начало так называемым “спящим” метастазам, в которых раковые клетки не делятся, другие начинают активно пролиферировать, что приводит к развитию нового опухолевого очага [13]. Обнаружение мРНК *MAGEA1-6*, *GAGE1-8*, *NY-ESO-1*, *SSX1*, 2 и 4, *XAGE1* и *MAGEC1* в периферической крови больных колоректальным раком является показателем циркуляции раковых

**Таблица 2.** Определение мРНК СТ-генов во фракциях периферической крови на разных стадиях колоректального рака

Фракции периферической крови	Стадия заболевания			
	I	II	III	IV
Плазма				
EDTA-элюат				
Трипсиновый элюат				
Клетки после десорбции				

Примечание. Фракции периферической крови, в которых обнаружена мРНК СТ-генов, отмечены штриховкой.

клеток в кровяном русле, при этом их циркуляция регистрируется уже на ранних стадиях заболевания. Отметим, что на стадии I заболевания мРНК тестированных генов выявляется в крови 62% обследованных пациентов, а на II – в 83%. Такая частота обнаружения мРНК СТ-генов в небольшом объеме периферической крови отражает высокую активность проникновения раковых клеток в кровь на ранних стадиях колоректального рака. Присутствие мРНК СТ-генов во фракции внеклеточных нуклеиновых кислот периферической крови на стадиях III и IV заболевания вызвано, вероятно, некротическими процессами, происходящими внутри опухолевого очага и характерными для поздних стадий развития онкологических заболеваний.

При сравнении наборов мРНК СТ-генов в клетках опухолевого очага и клетках, циркулирующих в крови того же больного, в крови в большинстве случаев выявляется меньшее число наименований мРНК, чем в опухолевом очаге. В 37 образцах опухолевых очагов детектировалось от трех до шести наименований семейств исследуемых мРНК, а в образцах периферической крови тех же больных – от одного до трех (из шести проанализированных семейств). В подавляющем большинстве случаев мРНК СТ-генов имеется и в периферической крови, и в опухолевом очаге. В периферической крови двух больных обнаружены мРНК, которые не выявляются в образцах опухоли. Известно, что популяция раковых клеток внутри опухоли неоднородна по профилям экспрессии генов [14]. Обнаружение меньшего числа активных СТ-генов в опухолевых клетках, циркулирующих в кровяном русле, по сравнению с опухолевым очагом, связано, вероятно, с отсутствием в крови клеток, экспрессирующих недостающие гены. Однако, у двух больных в периферической крови обнаружилась мРНК СТ-генов, которой нет в опухолевом очаге. По-видимому, в процессе инвазии и циркуляции с током крови в опухолевых клетках происходит изменение профиля экспрессии генов в ответ на смену окружающих условий. Еще одной причиной может быть неоднородность опухолевого очага, который использовали для получения материала для анализа. За счет поликлональности опухоли спектр экспрессии СТ-генов в клетках, мигрирующих в кровь, может быть богаче спектра экспрессии СТ-генов в произвольно взятом для анализа фрагменте опухоли.

В работе Кронрайта (Cronwright) и соавт. [15] обнаружена экспрессия СТ-генов в стволовых клетках мезенхимы человека, которая эпигенетически подавляется при дифференцировке клеток. На примере меланомной клеточной линии установлено, что подавление экспрессии девяти предшественников генов семейства SSX приводит к снижению подвижности клеток. Сравнительная функ-

циональную роль СТ-генов в мезенхимальных стволовых клетках и клетках опухолевых линий, авторы пришли к заключению, что раковые клетки, экспрессирующие СТ-гены, относятся к стволовым клеткам опухоли. Такие клетки отвечают за рост биомассы опухоли и способны к метастазированию. Экспрессия СТ-генов регистрируется в клетках первичных опухолей различного происхождения и локализации, хотя ее уровень может варьировать при разных заболеваниях [3]. Известно, что обнаружение экспрессии СТ-генов в первичных опухолях при различных онкозаболеваниях ухудшает прогноз, что связано с возобновлением роста опухоли после хирургического вмешательства или с появлением метастазов [1618]. Представленные нами данные подтверждают, что рост и метастазирование клеток связано с экспрессией СТ-генов опухоли. Ранее как нами, так и другими исследователями сообщалось о частых случаях обнаружения мРНК СТ-генов в периферической крови больных такими распространенными онкологическими заболеваниями, как рак молочной железы, легкого, желудка, печени, меланомы, и другими [7, 10, 19]. Появление мРНК СТ-генов в периферической крови больных раком свидетельствует о присутствии в кровотоке циркулирующих опухолевых клеток. Высокая вероятность появления одновременно нескольких мРНК СТ-генов на ранних стадиях многих онкологических заболеваний позволяет использовать этот тест для обнаружения тех образцов крови, которые содержат метастазирующие опухолевые клетки, т.е. для диагностики заболевания и мониторинга проводимой терапии.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (№09-04-97081-р-поволжье), Министерства промышленности и инноваций Нижегородской области, ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы и ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (ГК №16.512.11.2040).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaffer C.L., Weinberg R.A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. **331**, 1559–1564.
2. Wicha M.S., Hayes D.F. 2011. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1508–1511.
3. Simpson A. J. G., Caballero O. L., Jungbluth A., et al. 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Rev.* **5**, 615–625.
4. Laduron S., Deplus R., Zhou S., et al. 2004. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase

- HDAC1 to repress transcription. *Nucl. Acids Res.* **32**, 4340–4350.
5. Gjerstorff M.F., Kock K., Nielsen O., Ditzel H.J. 2007. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum. Reprod.* **4**, 953–960.
  6. Lorient A., De Plaen E., Boon T., De Smet C. 2006. Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of MAGE-A1 in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 10118–10126.
  7. Zhao L., Mou D.C., Peng J.R., et al. 2010. Diagnostic value of cancer-testis antigen mRNA in peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients. *World J. Gastroenterol.* **16**, 4072–4078.
  8. Vlassov V.V., Laktionov P.P., Rykova E.Y. 2010. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers. *Curr. Mol. Med.* **10**, 142–165.
  9. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* **162**, 156–159.
  10. Park J., Kwon T.K., Kim I., et al. 2002. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J. Immunol. Meth.* **266**, 79–86.
  11. Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Хоффман А.Л., и др. 2008. Циркулирующие внеклеточные ДНК и РНК крови в диагностике опухолей молочной железы. *Биомедицинская химия.* **54**, 94–103.
  12. Almeida L.G., Sakabe N.J., de Oliveira A.R., et al. 2009. CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucl. Acids Res.* **37**, D816–819.
  13. Bacac M., Stamenkovic I. 2008. Metastatic cancer cell. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 221–247.
  14. Talmadge J.E. 2007. Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res.* **67**, 11471–11475.
  15. Cronwright G., Le Blanc K., Gotherstrom C., et al. 2005. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.* **65**, 2207–2215.
  16. Kruger S., Ola V., Feller A.C., et al. 2007. Expression of cancer-testis antigen CT7 (MAGE-C1) in breast cancer: an immunohistochemical study with emphasis on prognostic utility. *Pathol. Oncol. Res.* **13**, 91–96.
  17. Andrade V.C., Vettore A.L., Felix R.S., et al. 2008. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* **8**, 2–8.
  18. Grah J., Samija M., Juretic A., et al. 2008. Immunohistochemical expression of cancer/testis antigens (MAGE-A3/4, NY-ESO-1) in non-small cell lung cancer: the relationship with clinical-pathological features. *Coll. Antropol.* **32**, 731–736.
  19. Новиков Д.В., Белова Т.В., Пегов Р.Г., и др. 2009. Частота обнаружения мРНК MAGE-A в крови онкологических больных. *Клинич. лаборатор. диагностика.* **4**, 25–27.