

# Цінність мікро-РНК-508-3р у діагностиці раку нирки

О.О. Строй<sup>1</sup>, О.Б. Банира<sup>3</sup>,  
В.Є. Досенко<sup>2</sup>, Д.О. Строй<sup>2</sup>, О.В. Шуляк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

<sup>2</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

<sup>3</sup>2-га Комунальна міська поліклініка м. Львова

Специфічний маркер раку нирки, на відміну від багатьох онкологічних захворювань, поки відсутній. За останні роки виявлено декілька мікро-РНК (miR), які можуть претендувати на роль маркера раку нирки. Нашою метою було встановлення цінності miR-508-3р як діагностичного маркера крові при цьому захворюванні. Після аналізу рівнів експресії miR-508-3р у крові 28 пацієнтів із раком нирки та у 27 здорових досліджуваних встановлено, що при раку нирки рівень експресії досліджуваної мікро-РНК достовірно нижчий, ніж у нормі, а за cut-off рівня експресії miR-508-3р при раку нирки можна вважати показник 12,0 у.о. Специфічність miR-508-3р у діагностиці раку нирки за нашими даними становить 91%, а чутливість — 84%. Отже, miR-508-3р можна застосовувати як діагностичний маркер крові при раку нирки.

**Ключові слова:** рак нирки, маркер, мікро-РНК, miR-508-3р.

## Вступ

Застосування маркерів онкологічних захворювань дозволяє виявляти пухлини різних органів і тканин, а також контролювати перебіг захворювання. Залежно від кінцевої мети, з якою вони застосовуються, маркери пухлинного росту розподіляються на (Li M., Rathmell W.K., 2012):

а) біомаркери раннього виявлення — дозволяють проводити скринінг пацієнтів на наявність у них раку нирки (renal cell carcinoma — RCC);

б) діагностичні біомаркери — дозволяють визначити гістологічний тип RCC, а також підтвердити чи виключити діагноз RCC;

в) прогностичні біомаркери — виявляють певні ознаки, які корелюють з особливостями клінічного перебігу пухлини та/чи клінічним прогнозом;

г) біомаркери передбачення — дозволяють спрогнозувати рівень терапевтичної відповіді на лікування та здійснювати моніторинг ефективності медикаментозного лікування.

Залежно від біологічного середовища, у якому вони визначаються, імовірно маркери раку нирки представлені тканинними маркерами, маркерами крові та маркерами сечі.

Специфічний маркер раку нирки, на відміну від багатьох онкологічних захворювань, поки відсутній. За останні декілька років у світі проведено численні дослідження з визначення діагностичної цінності мікро-РНК при цьому захворюванні. Визначали експресію мікро-РНК як у тканинах пухлин, так і в сироватці крові пацієнтів. Завдяки зручності забору досліджуваного матеріалу, а також можливості застосування з метою скринінгу і достатньо високої об'єктивності саме маркери крові є перспективними для застосування з метою діагностики злоякісних пухлин нирок.

Нами проведено ґрунтовний аналіз результатів усіх сучасних досліджень щодо визначення маркера раку нирки (Банира О.Б. та співавт., 2012). Визначення специфічної

для певної патології мікро-РНК ґрунтується на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). На першому етапі здійснюють визначення спектра значної кількості ( $\geq 200$ ) мікро-РНК. На другому етапі виявляють ті мікро-РНК, які є специфічними для цього захворювання.

За останні роки виявлено декілька мікро-РНК, які можуть претендувати на роль маркера раку нирки. За даними L.M. Wulfken та співавторів (2011), miR-1233 експресована у пацієнтів із RCC. Чутливість цього маркера сягає 77,4%, специфічність — 37,6%. За даними M. Redova та співавторів (2012), одночасне визначення концентрацій miR-378 та miR-451 у сироватці крові дозволяє ідентифікувати RCC у досліджуваних пацієнтів із чутливістю 81% та специфічністю 83% (площа під кривою (area under the curve — AUC) 0,86). За даними O. Slaby та співавторів (2010), miRNA-106b можна вважати потенційним маркером, який дозволяє діагностувати появу ранніх метастазів після нефректомії у пацієнтів із RCC.

Навесні 2012 р. було опубліковано результати дослідження Q. Zhai та співавторів, які вперше навели докази діагностичної цінності miR-508-3р як тканинного маркера та маркера крові при RCC. Такі висновки зроблено після порівняння експресії miR-508-3р у зразках крові та біоптатах пухлин 10 пацієнтів із раком нирки та зразках ниркової паренхіми і крові здорових досліджуваних. Авторами підсумовано, що для встановлення справжньої цінності miR-508-3р як біомаркера RCC необхідні подальші дослідження.

Мета дослідження — встановлення цінності miR-508-3р як діагностичного маркера крові при RCC.

## Об'єкт і методи дослідження

Протягом 2011–2012 рр. здійснено забір зразків крові у 33 пацієнтів із пухлинами нирок, які попередньо були виявлені

за допомогою ультразвукового дослідження та комп'ютерної томографії. Також забрано зразки крові у 27 здорових досліджуваних (контрольна група). Усі зразки було піддано кріоконсервації при  $-25^{\circ}\text{C}$ .

Більшість пацієнтів із пухлинами нирки ( $n=27$ ) були прооперовані з подальшим патогістологічним дослідженням видалених пухлин. За даними гістологічного дослідження у 22 пацієнтів виявлено рак нирки, у 5 — різні види аденом та ангіоміоліпоми значного розміру. Решта хворих із дисемінованим раком нирки і тяжким загальносоматичним станом ( $n=6$ ) або відмовилися від паліативного оперативного лікування, або ж оперативне втручання у них супроводжувалося високим ризиком виникнення тяжких ускладнень, тому ці пацієнти не могли бути кандидатами на оперативне лікування.

Здійснено визначення експресії miR-508-3р у зразках цільної крові всіх 33 пацієнтів із пухлинами нирок та у контрольній групі із застосуванням методики TaqMan. У 20 із 27 прооперованих пацієнтів із пухлинами нирок проводили визначення експресії miR-508-3р вдруге через 8–10 діб після оперативного лікування. Визначення експресії зазначеної мікро-РНК проводилось у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Під час аналізу отриманих результатів використовували загальноприйнятні біостатистичні методики (Norman G.R., Streiner D.L., 2008; Zar J.H., 2009).

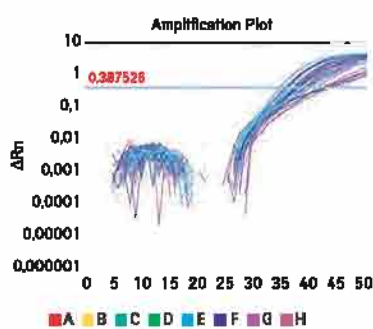
## Виділення тотальної РНК

Тотальну РНК виділяли з крові хворих із використанням miRvana PARIS (Ambion, США) відповідно до протоколу, запропонованого виробником. Концентрацію РНК вимірювали за допомогою спектрофотометра «NanoDrop ND1000» («NanoDrop Technologies», США).

**Зворотна транскрипція та ПЛР у реальному часі**

Зворотну транскрипцію проводили з використанням набору «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit» («Applied Biosystems», США), специфічних праймерів для кожної мікроРНК та 10 нг тотальної РНК. Кількісну ПЛР у реальному часі проводили з використанням «TaqMan MicroRNA Assays» («Applied Biosystems», USA): U6 snRNA (як ендогенний контроль), hsa-miR-508-3p. Температурні цикли ПЛР були такі: крок ініціальної денатурації 95 °C 10 хв; 45 циклів 95 °C — 15 с та 60 °C — 60 с. Ампліфікацію проводили на «7500 Fast Real-time PCR» («Applied Biosystems», США). Отримані результати були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення «7500 Fast Real-time PCR» та відображені за допомогою графіків (рис. 1).

**Рис. 1**



Графік приросту інтенсивності флуоресценції в ході ПЛР у реальному часі

Отримані результати підлягали статистичному аналізу. З метою визначення різниці рівнів експресії мікро-РНК між групою хворих із пухлинами нирки до операції та контрольною групою був використаний однофакторний дисперсійний аналіз. Нормальність розподілу даних була оцінена за допомогою тесту Колмогорова — Смирнова. Значних відхилень від нормального розподілу не виявлено ( $Z=1,279$ ;  $p=0,076$ ). Рівність дисперсій рівня експресії мікро-РНК між двома групами оцінювали за допомогою тесту Левіна ( $L=10,354$ ;  $p=0,003$ ). Згідно з результатами тесту Левіна, спостерігається неоднорідність дисперсій у двох групах (гетероскедастичність), тому в подальшому аналізі була застосована модифікація дисперсійного однофакторного аналізу, а саме тести Брауна — Форсайта і Уелча. Графічні зображення рівнів медіани та середнього арифметичного експресії маркера в обох групах наведено на рис. 2 та 3.

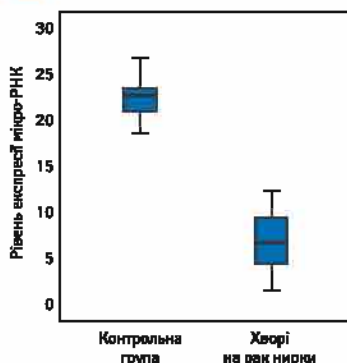
Описову статистику даних наведено у табл. 1.

Результати застосування однофакторного дисперсійного аналізу із корекціями Уелча та Брауна — Форсайта наведено у табл. 2. В обох тестах  $p=0,01$ , що свідчить про значиму різницю рівнів експресії мікро-РНК між контрольною групою та групою пацієнтів із раком нирки.

У 6 пацієнтів із дисемінованим раком нирки, які за станом здоров'я не змогли бути кандидатами на оперативне втручання, рівень miR-508-3p становив  $4,902 \pm 2,41$ ,

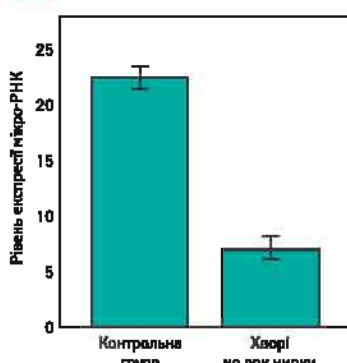
що є характерним для пацієнтів із раком нирки згідно з нашими розрахунками.

**Рис. 2**



Медіана та дисперсія експресії miR-508-3p у крові хворих на рак нирки та в контрольній групі

**Рис. 3**

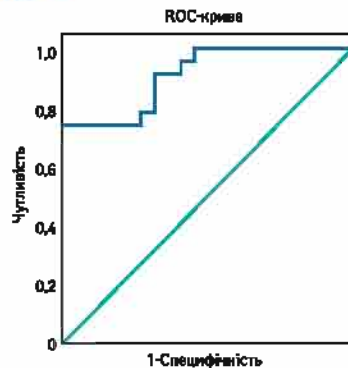


Середні арифметичні значення експресії miR-508-3p у хворих на рак нирки та осіб контрольної групи з 95% довірчим інтервалом (ДІ)

Група прооперованих хворих із пухлинами нирок налічувала 27 осіб, але у 5 з них після оперативного втручання виявлено доброякісні новоутворення. Рівень експресії мікро-РНК у цих 5 пацієнтів у середньому перебував у межах показника контрольної групи ( $22,2734 \pm 3,4897$ ), тому результати їх обстеження були вилучені із загальних розрахунків та проаналізовані окремо.

Специфічність miR-508-3p у діагностиці раку нирки за нашими даними становить 91%, а чутливість — 84% (рис. 4).

**Рис. 4**



Графічне зображення співвідношення між чутливістю та специфічністю за допомогою ROC-кривої (ROC — receiver operational characteristic, операційна характеристика приймача)

Площа під кривою за нашими даними становить 90,9%, що свідчить про дуже хорошу класифікаційну спроможність клінічного маркера (табл. 3).

За допомогою індексу Юдена  $J = \text{максимум (чутливість + специфічність)}$  була вибрана оптимальна величина відсічення (cut-off value) з метою максимізації як чутливості, так і специфічності клінічного маркера. Величина відсічення становить  $>12,0$  у.о. при чутливості 84% та специфічності 91%.

Нами також проведено визначення експресії miR-508-3p у цільній крові 20 із 27 прооперованих пацієнтів із пухлинами нирки через 8–10 діб після оперативного лікування; у 7 прооперованих пацієнтів провести повторне дослідження не вдалося з різних причин. Отримано контраверсійні результати, згідно з якими частини пацієнтів ( $n=11$ ) рівень маркера після операції зростає, а в інших ( $n=9$ ) навпаки — знижується (рис. 5). Суттєве зростання рівня маркера порівняно з вихідним відзначали у 9 хворих, зниження — у 5, ще у 6 пацієнтів (у 3 із них згодом діагностовано доброякісні пухлини), ці зміни перебували у межах статистичної похибки.

**Таблиця 1**

Середні арифметичні значення експресії miR-508-3p у хворих на рак нирки та осіб контрольної групи з 95% ДІ

Група	Число обстежених	Середнє арифметичне	Стандартне відхилення	95% ДІ для середнього арифметичного		min	max
				Нижня межа	Верхня межа		
Рак нирки	26	7,3291	4,10782	5,7363	8,9219	1,57	22,33
Доброякісні пухлини	5	22,2734	3,4897	-	-	18,79	25,76
Контроль	27	23,1511	3,42642	21,4471	24,8550	18,48	29,90

**Таблиця 2**

Робастні тести на рівність середніх арифметичних експресій miR-508-3p у хворих на рак нирки та осіб контрольної групи

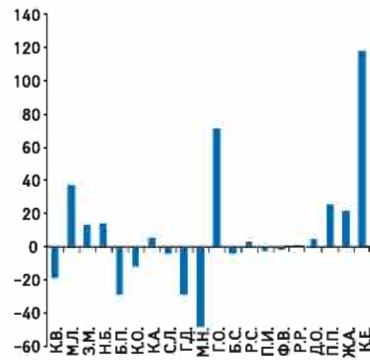
Тести	Статистика	p
Уелча	56,383	0,01
Брауна — Форсайта	56,383	0,01

**Таблиця 3**

Показники, що характеризують площу під кривою

AUC	Стандартна похибка	p	95% ДІ	
			Нижня межа	Верхня межа
0,909	0,042	<0,001	0,827	0,991

Рис. 5



Динаміка експресії miR-508-3p у хворих із пухлинами нирки до та після оперативного лікування

На нашу думку, значне підвищення рівня маркера може бути зумовлено повним видаленням пухлини за відсутності метастазів, а суттєве зниження — навпаки, неповним видаленням пухлини та/чи наявністю метастазів. Однак підтвердження чи спростування цієї гіпотези та встановлення цінності miR-508-3p як прогностичного маркера потребує ретельного подальшого дослідження з детальним вивченням усіх особливостей клінічного перебігу захворювання у кожного пацієнта.

Діагностична цінність онкомаркера визначається його специфічністю та чутливістю. Специфічність онкомаркера 100% означає, що такий маркер взагалі не визначається при доброякісних пухлинах та у здорових досліджуваних. Чутливість онкомаркера 100% означає, що цей маркер визначає наявність раку у 100% випадків, навіть на ранніх стадіях. На жаль, ідеального маркера із чутливістю та специфічністю 100% на сьогодні не існує для жодного онкозахворювання.

При встановленні дійсної цінності пухлинного маркера принциповим також є верхня/нижня межа концентрації маркера у здорових досліджуваних (так званий cut-off — рівень відсікання). При встановленні cut-off на занадто низькому рівні отримують значну кількість хибнопозитивних результатів, відбувається зменшення специфічності маркера, водночас виявляється максимальна кількість злоякісних пухлин. При підвищенні показника cut-off підвищується ймовірність позитивного результату тестування із дійсним виявленням пухлини. Щоправда, тоді збільшується частка хибнонегативних результатів, тобто знижується чутливість маркера. Ця закономірність збережена у випадках, якщо рівень маркера у хворих онкологічного профілю вищий, ніж у здорових досліджуваних. Якщо ж рівень маркера при пухлинах нижчий, ніж у здорових досліджуваних, зрозуміло, що залежність між чутливістю, специфічністю та cut-off зворотна. У більшості наявних маркерів онкозахворювань використовують узгоджені авторитетними фахівцями рівні cut-off, що дозволяють встановити діагноз cut-off з найменшою похибкою.

Зазвичай за cut-off приймають нижню межу 95% ДІ показника, якщо при патології показник вищий, ніж у нормі. І навпаки, якщо при патології показник маркера нижчий, ніж

у нормі, за cut-off приймають верхню межу 95% ДІ. Тобто, враховуючи наші результати і той факт, що при раку нирки рівень експресії досліджуваної мікро-РНК достовірно нижчий, ніж у нормі, за cut-off рівня експресії miR-508-3p при раку нирки можна вважати показник 12,0 у.о. Усі випадки із показником експресії маркера нижчим за цю межу можна вважати раком нирки із достовірністю 84% (рівень чутливості).

У світі поки не розроблені спектри рівнів усіх мікро-РНК, які б дозволяли класифікувати пацієнтів як здорових чи хворих. Q. Zhai та співавтори (2012) зазначили, що у плазмі крові пацієнтів із раком нирки рівень експресії miR-508-3p є достовірно нижчим, ніж у здорових досліджуваних. Наведені нами результати свідчать, що у разі експресії miR-508-3p у зразках цільної крові в межах  $7,3291 \pm 4,10782$  з високою ймовірністю у пацієнта наявна злоякісна пухлина нирки, якщо ж експресія miR-508-3p знаходиться у межах  $23,1511 \pm 3,42642$  та вище, з високою ймовірністю (91%) у пацієнта рак нирки відсутній. Проміжок від  $7,3291 \pm 4,10782$  (тобто від 11,43692) до  $23,1511 - 3,42642$  (тобто до 19,7249) є так званою «сірою зоною», коли ймовірність наявності патології є низькою та коливається в межах 5–10%, проте зробити висновки про гістологічну природу пухлини однозначно неможливо, а пацієнти потребують динамічного спостереження із повторним визначенням маркера та оцінкою його динаміки. Варто зазначити, що у нашому дослідженні вкрай незначна кількість пацієнтів (2 із групи хворих на рак нирки та 1 — із контрольної) демонстрували експресію miR-508-3p у цьому діапазоні.

## Висновки

1. Мікро-РНК-508-3p (miR-508-3p) можна застосовувати як діагностичний маркер крові при раку нирки із властивою йому специфічністю 91% та чутливістю 84%.
2. Для встановлення прогностичної цінності експресії miR-508-3p при раку нирки необхідне проведення подальших досліджень.

## Список використаної літератури

- Баніра О.Б., Строй О.О., Шуляк О.В.** (2012) Рак нирки: пошук універсального маркера. Укр. мед. часопис, 2 (88) : 55–61.
- Li M., Rathmell W.K.** (2012) Biomarkers for Renal Cell Carcinoma. *Kidney Cancer: Principles and Practice*, Primo N. Lara Jr., Jonasch Eric (Eds.), Springer, p. 47–65.
- Norman G.R., Streiner D.L.** (2008) *Biostatistics: The Bare Essentials*, 3rd Ed. PMPH-USA, 393 p.
- Redova M., Poprach A., Nekvindova J. et al.** (2012) Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.*, 10(1): 55.
- Slaby O., Jancovicova J., Lakomy R. et al.** (2010) Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 29: 90.
- Wulfken L.M., Moritz R., Ohlmann C. et al.** (2011) MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One*, 6(9): e25787.
- Zar J.H.** (2009) *Biostatistical Analysis*, 5th Edition. Prentice Hall, New York, 960 p.

**Zhai Q., Zhou L., Zhao C. et al.** (2012) Identification of miR-508-3p and miR-509-3p that are associated with cell invasion and migration and involved in the apoptosis of renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 419(4): 621–626.

## Цінність мікро-РНК-508-3p в діагностиці рака почки

**А.А. Строй, О.Б. Баніра, В.Е. Досенко, Д.А. Строй, А.В. Шуляк**

**Резюме.** Специфический маркер рака почки, в отличие от многих онкологических заболеваний, пока отсутствует. За последние годы выявлено несколько микро-РНК (miR), которые могут претендовать на роль маркера рака почки. Нашей целью было установление ценности miR-508-3p как диагностического маркера крови при этом заболевании. После анализа уровней экспрессии miR-508-3p в крови 28 пациентов с раком почки и 27 здоровых испытуемых установлено, что при раке почки уровень экспрессии исследуемой микро-РНК достоверно ниже, чем в норме, а за cut-off уровня экспрессии miR-508-3p при раке почки можно считать показатель 12,0 у.е. Специфичность miR-508-3p в диагностике рака почки по нашим данным составляет 91%, а чувствительность — 84%. Итак, miR-508-3p можно применять в качестве диагностического маркера крови при раке почки.

**Ключевые слова:** рак почки, маркер, микро-РНК, miR-508-3p.

## The value of miR-508-3p in kidney cancer diagnostics

**O.O. Stroy, O.B. Banyra, V.E. Dosenko, D.O. Stroy, O.V. Shulyak**

**Summary.** In contrast to many cancers the specific marker of kidney cancer is not identified yet. During the last years there were revealed several micro-ribonucleic acids (miRNAs, miRs) which could be claimed as a markers of kidney cancer. Our aim was to determine the value of miR-508-3p as a blood-based diagnostic marker in patients with renal cell carcinoma and 27 healthy subjects we revealed that this marker expression level in kidney cancer group was significantly lower than in normal persons, and the cut-off level of miR-508-3p expression for kidney cancer diagnosing can be considered at 12.0 c.u. According to our data the specificity of miR-508-3p in the diagnosing of kidney cancer is 91% and sensitivity is 84%. Thus, miR-508-3p can be used as a blood-based diagnostic marker of kidney cancer.

**Key words:** kidney cancer marker, micro-RNA, miR-508-3p.

## Адреса для листування:

Строй Олександр Олександрович  
79010, Львів, вул. Пекарська, 52  
Львівський національний медичний  
університет ім. Данила Галицького,  
кафедра урології  
E-mail: addictive.signals@gmail.com