

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *NKX2-2*, *STEAP1* И *CCND1* ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ СЕМЕЙСТВА САРКОМЫ ЮИНГА

А.Е. Друй^{1,2,3}, Г.А. Цаур^{1,3}, А.М. Попов^{1,3}, А.С. Демина^{1,3}, Т.О. Ригер^{1,3}, С.Н. Тупоногов¹,
Е.В. Шориков^{1,3}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, С.В. Цвиренко^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,3}

¹ ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1, г. Екатеринбург

² ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия, г. Екатеринбург

³ ГБУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

Ключевые слова: опухоли семейства саркомы Юинга, костный мозг, ПЦР в режиме реального времени, *NKX2-2*

Исследована возможность применения определения экспрессии *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для оценки поражения костного мозга (КМ) у пациентов с опухолями семейства саркомы Юинга (СЮ). Экспрессия генов проанализирована в 59 образцах КМ от 6 больных СЮ/примитивной нейроэктодермальной опухолью с перестройками гена *EWS*, 20 образцах КМ от 5 пациентов без перестроек *EWS*, 8 образцах КМ от 8 пациентов без злокачественных опухолей (контрольная группа), клеточной линии SK-N-MC и 9 образцах аутологичных периферических стволовых клеток пациентов. Образцы КМ расценивались как позитивные в случае выявления экспрессии химерных генов *EWS-FLI1*, *EWS-ERG* методом гнездовой ПЦР или обнаружения опухолевых клеток в цитологических препаратах. При проведении исследования установлено, что экспрессия гена *NKX2-2* не определяется в КМ пациентов без злокачественных опухолей, присутствует в 16 из 17 позитивных образцов КМ и отсутствует в 39 из 42 негативных образцов. Экспрессия анализируемых маркеров за исключением *STEAP1* оставалась стабильной во время лечения. Проведенный анализ характеристических кривых (ROC-анализ) позволил установить пороговые уровни экспрессии каждого маркера, на основании которых были рассчитаны диагностические характеристики. *NKX2-2* имеет высокие показатели прогностической ценности позитивного и негативного результатов (0,889 и 0,976 соответственно) для выявления поражения КМ у пациентов с опухолями семейства СЮ как на момент диагностики, так и в ходе терапии. Диагностическая эффективность маркера составила 0,949. Использование *STEAP1* и *CCND1* имеет меньшую диагностическую ценность.

Введение

Опухоли семейства саркомы Юинга (саркома Юинга (СЮ), периферическая примитивная нейроэктодермальная опухоль (ПНЭО), опухоль Аскина) представляют собой группу злокачественных новообразований костей, встречающуюся преимущественно у детей и подростков. Клиническое течение заболевания у детей более агрессивное, чем у пациентов старших возрастных групп, при этом 22–38% пациентов имеют отдаленные гематогенные метастазы на момент первичной диагностики опухоли [1]. Наиболее частыми объектами метастазирования являются легкие, кости скелета, костный мозг (КМ). Инициальная диагностика поражения

КМ при СЮ/ПНЭО необходима для корректного стадирования заболевания и стратификации пациентов на группы риска [2, 3]. Наличие минимальной метастатической болезни, определяемое в ходе лечения, характеризует неполный ответ опухоли на проводимую терапию, обуславливает развитие рецидивов заболевания и является неблагоприятным прогностическим фактором [4].

Цитологическое исследование аспиратов КМ наиболее широко применяется для выявления поражения КМ при различных злокачественных заболеваниях, в том числе при опухолях семейства СЮ. Однако в рутинной практике чувствительность данного метода редко превышает 1×10^{-2} . Для определения клеток СЮ/ПНЭО в большинстве случаев необходимо использование более чувствительных методов. С этой целью могут быть использованы иммуноцитологическое исследование препаратов КМ и выявление экспрессии специфичных для

Адрес для корреспонденции

Друй А.Е.

E-mail: Dr-Druy@yandex.ru

клеток опухоли генов с помощью ПЦР. Аналитическая чувствительность при использовании данных методов может достигать 1×10^{-4} – 1×10^{-5} [5].

В большинстве случаев опухоли семейства СЮ характеризуются специфическими генетическими перестройками с участием гена *EWS*, локализуемому на локусе 22q12 [6, 7]. Наиболее частым партнерским геном является ген *FLII* (85%), при этом в результате транслокации t(11:22)(q24;q12) образуется химерный ген *EWS-FLII*. Второй по частоте вариант перестройки, встречающийся, ориентировочно, в 10% случаев, – t(21:22)(q22;q12) *EWS-ERG*. Более редкие транслокации t(7:22)(p22;q12), t(17:22)(q12;q12), t(2:22)(q33;q12) с участием генов *ETV1*, *EIAF*, *FEV*, соответственно, встречаются не более чем в 5% опухолей [8–10]. Выявление мРНК химерного гена с помощью гнездной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) является надежным инструментом для выявления клеток СЮ/ПНЭО в КМ пациентов как на момент первичной диагностики, так и в ходе лечения. Наличие химерных транскриптов в КМ больных как локализованными, так и диссеминированными формами СЮ/ПНЭО достоверно снижало показатели общей и бессобытийной выживаемости в соответствующих группах [11]. Однако не во всех случаях опухоль имеет специфические генетические aberrации, кроме того, возможно образование атипичных химерных транскриптов, идентификация которых требует проведения дополнительных исследований, что зачастую невозможно в рутинной работе. Это послужило причиной продолжения поиска диагностической методики, которая наряду с детекцией мРНК химерных генов позволяла бы определять остаточные опухолевые клетки в КМ. При этом, являясь универсальной, она давала бы возможность проводить исследование у больных без выявляемых перестроек гена *EWS* в первичной опухоли, а также в случае наличия атипичных химерных транскриптов без необходимости их дальнейшей идентификации.

Экспрессия гена, применяемого для выявления клеток СЮ/ПНЭО в КМ, должна отсутствовать в клетках нормального КМ либо величина ее в опухолевых клетках должна быть многократно выше. Для оценки поражения КМ при данных опухолях наиболее оправдано определение экспрессии генов, специфичных для клеток нейроэктодермальной природы.

Cheung с соавторами проанализировали профиль экспрессии генов в 28 образцах СЮ/ПНЭО, а также в 10 образцах клеточных линий, полученных из данных опухолей, и выявили 10 генов (*CCND1*, *PKP1*, *NKX2-2*, *STEAP1*, *TMEM47*, *CSPG5*, *FLRT2*, *MART*, *WNT5A* и *FAT4*), которые потенциально могут быть использованы как маркеры поражения КМ. В ходе дальнейшего анализа 35 образцов КМ, негативных по данным световой микроскопии, была выявлена

наибольшая прогностическая значимость выявления экспрессии генов *CCND1*, *NKX2-2* и *STEAP1* как по отдельности, так и в составе диагностической панели маркеров [4].

Ген *CCND1* участвует в регуляции клеточного цикла через инактивацию продукта гена ретинобластомы (Rb), что приводит к переходу клеточного цикла из G1 в S фазу [12]. Кроме того, данный ген участвует в процессах ацетилирования гистоновых белков и ремоделирования хроматина, что реализуется в регуляции процессов клеточного роста, метаболизма и дифференцировки [13, 14]. Данный ген гиперэкспрессирован в клетках различных злокачественных опухолей, включая неходжкинские лимфомы, колоректальный рак, рак предстательной железы [15].

Экспрессия гена *NKX2-2* выявлена в клетках ЦНС в период эмбриогенеза, а также в α - и β -клетках панкреатических островков. Он вовлечен в процесс развития 5-гидрокситриптамин-зависимых нейронов [16], а также принимает участие в регуляции гликемии [17].

Ген *STEAP1* кодирует трансмембранный белок-транспортер, в норме выявляемый в клетках предстательной железы и мочевого пузыря. Экспрессия гена многократно увеличена в клетках рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака яичников, колоректального рака, а также СЮ [18].

В настоящее время для оценки поражения КМ и выявления остаточных опухолевых клеток с помощью молекулярных маркеров используется выявление химерных транскриптов *EWS-FLII*, *EWS-ERG* и др., в то время как возможность использования других молекулярных маркеров, в том числе анализа экспрессии опухоль-ассоциированных генов, до конца не выяснена.

Цель исследования — оценить возможность применения определения экспрессии *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* для выявления поражения костного мозга у пациентов с опухолями семейства СЮ.

Пациенты и методы исследования

Экспрессия генов *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* была исследована в 59 образцах КМ, полученном от 6 пациентов с верифицированным диагнозом СЮ/ПНЭО и наличием перестроек гена *EWS*, 20 образцах от 5 пациентов без выявленных перестроек *EWS*, 9 образцах препаратов аутологичных стволовых клеток периферической крови пациентов (ПСК). Все пациенты получали терапию в Областной детской клинической больнице № 1 (г. Екатеринбург) в период с 2006 по 2011 год. 27 образцов было взято на момент первичной диагностики, 44 образца — в ходе терапии, 6 — при диагностике рецидива. Для выявления экспрессии исследуемых генов клетками нормального КМ были изучены 8 образцов от 8 пациентов без злокачественных новообразований. В качестве позитивного контроля была использована

клеточная линия SK-N-MC, несущая транслокацию t(11:22)(q24;q12) *EWS-FLI1*.

В каждом образце общая РНК была выделена из 2×10^6 ядросодержащих клеток КМ с использованием TRI-reagent (Molecular Research Center, США) с последующей обработкой ДНКазой I (Fermentas, США). Концентрация выделенной РНК измерялась спектрофотометрически. Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием MMLV-обратной транскриптазы (ЦНИИЭ, Россия) и смеси случайных нонамеров (Синтол, Россия). Комплементарная ДНК (кДНК) в количестве, эквивалентном 100 нг РНК, служила матрицей в мультиплексной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве референсного гена был выбран ген *ABL*. ПЦР-РВ проводилась в конечном объеме 25 мкл с использованием TaqF ДНК-полимеразы (ЦНИИЭ, Россия) в присутствии 3,5 ммоль/мкл сульфата магния и смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 0,2 ммоль). Конечная концентрация праймеров и флуоресцентных зондов для генов *ABL*, *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* составила 180 нмоль и 120 нмоль соответственно. Дизайн праймеров и флуоресцентных зондов осуществлялся с использованием программы Clone Manager Suite 7.0, нуклеотидные последовательности приведены в табл. 1. Нормализованная величина экспрессии рассчитывалась как разность пороговых циклов гена *ABL* и гена-маркера ($\Delta Ct = Ct_{ABL} - Ct_{маркера}$).

опухоли и клеток SK-N-MC использовалась для выявления химерных транскриптов *EWS-FLI1* и *EWS-ERG* методом гнездовой ПЦР. Концентрация праймеров, используемых для гнездовой ПЦР, составила 300 нмоль, концентрации сульфата магния и дНТФ аналогичные, использовавшимся в ПЦР-РВ. Нуклеотидные последовательности праймеров для гнездовой ПЦР приведены в табл. 2.

Обнаружение химерного транскрипта и/или выявление опухолевых клеток при микроскопии цитологических препаратов было выбрано нами в качестве критерия наличия поражения костного мозга клетками СЮ/ПНЭО.

Для статистической обработки результатов применяли программы «Statistica 6.0» и «Analyse-it». Для сравнения количественных параметров в двух группах применялся критерий Манна–Уитни. Для сравнения качественных параметров использовался критерий χ^2 . Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Значимость определения экспрессии исследуемых генов была проанализирована методом характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых) [20, 21]. Площади под кривыми (ППК) сравнивали по методу Е. DeLong и соавторов [22]. Также определяли пороговые уровни (ПУ) показателей, характеризующиеся наибольшей диагностической эффективностью при разделении образцов, содержащих и не содержащих опухолевые клетки. С учетом пороговых уровней

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентных зондов для ПЦР-РВ

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
<i>NKX2-2</i>	tac-gac-agc-agc-gac-aac	ctt-gga-gct-tga-gtc-ctg-ag	Cy5-agc-acc-gag-ggc-ctt-cag-ta-BHQ2
<i>STEAP1</i>	gag-gcg-atc-cta-cag-ata-caa-g	aga-tgt-cac-agc-caa-cag-ag	R6G-tgg-gca-tat-caa-cag-gtc-ca-BHQ1
<i>CCND1</i>	aga-tca-tcc-gca-aac-acg	cgg-gtc-aca-ctt-gat-cac	ROX-acc-ttc-gtt-gcc-ctc-tgt-gc-BHQ2
<i>ABL</i> [19]	agc-tcc-ggg-tct-tag-gct-at	tag-ttg-ctt-ggg-acc-cag-cc	FAM-cca-ttt-ttg-gtt-tgg-gct-tca-cac-cat-t-BHQ1

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для гнездовой ПЦР

Ген	Этап	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>EWS-FLI1</i>	ПЦР1	act-ccc-cgt-tgg-tcc-cct-cc	tcc-tac-agc-caa-gct-cca-agt-c
	ПЦР2	cag-gtg-ata-cag-ctg-gcg	cca-aca-gag-cag-cag-cta-c
<i>EWS-ERG</i>	ПЦР1	act-ccc-cgt-tgg-tgc-ctt-cc	tcc-tac-agc-caa-gct-cca-agt-c
	ПЦР2	cag-gtg-atg-cag-ctg-gag	cca-aca-gag-cag-cag-cta-c

Аналитическая чувствительность методики оценивалась с использованием 10-кратных разведений РНК, выделенной из клеток линии SK-N-MC, а также смеси РНК из ткани опухоли 10 пациентов с верифицированным диагнозом СЮ/ПНЭО. С этой целью РНК разводили в смеси РНК ядросодержащих клеток, выделенных из периферической крови 5 здоровых доноров.

Образцы КМ исследовали цитологически с окрашиванием препаратов по методу Романовского–Гимзе. Кроме того, кДНК из КМ, ткани

для каждого теста рассчитывали диагностическую чувствительность, специфичность, прогностическую ценность положительного и отрицательного результатов, а также общую диагностическую эффективность теста [23, 24].

Результаты исследования

Матричная РНК генов *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* была выявлена во всех образцах клеточной линии SK-N-MC. При анализе серийных разведений РНК, выделенной из клеток SK-N-MC, а также смеси

РНК, выделенной из 10 образцов ткани опухоли, в РНК из лейкоцитов периферической крови здоровых доноров, аналитическая чувствительность определения всех исследованных маркеров и выявления химерного транскрипта *EWS-FLI1* достигала 1×10^{-6} .

Ни в одном из 8 образцов КМ пациентов без злокачественных опухолей экспрессия *NKX2-2* не была выявлена. Матричная РНК *CCND1* и *STEAP1* была обнаружена во всех образцах.

Среди исследованных 59 образцов КМ больных с наличием перестроек гена *EWS* 17 (28,8%) соответствовали хотя бы одному из выбранных критериев позитивности. Из них 8 было взято на момент диагностики и 9 – во время терапии. Количество позитивных образцов, экспрессирующих исследуемые маркеры, представлено в табл. 3.

Таблица 3. Количество позитивных образцов, экспрессирующих исследуемые маркеры

	<i>NKX2-2</i>	<i>STEAP1</i>	<i>CCND1</i>
Перед началом терапии	7	8	8
В ходе терапии	9	9	9
Наличие экспрессии	16	17	17
Отсутствие экспрессии	1	0	0

Экспрессию исследуемых генов в позитивных образцах сравнивали с таковой в негативных, а также в образцах пациентов контрольной группы. Результаты качественного сравнения представлены в табл. 4.

Таблица 4. Количество образцов, экспрессирующих исследуемые маркеры

	<i>NKX2-2</i>	<i>STEAP1</i>	<i>CCND1</i>
Позитивные образцы	16/17	17/17	17/17
Негативные образцы	3/42	42/42	42/42
Контрольная группа	0/8	8/8	8/8
p	<0,01	1,00	1,00

Таким образом, экспрессия гена *NKX2-2* в позитивных образцах определялась достоверно чаще, чем в негативных и контрольных, тогда как частота обнаружения экспрессии *CCND1* и *STEAP1* в позитивных, негативных и контрольных образцах достоверно не отличалась. Различий в частоте выявления экспрессии *NKX2-2*, *CCND1* и *STEAP1* между негативными и контрольными образцами также выявлено не было ($p=0,70$, $p=0,79$ и $p=0,79$ соответственно).

Количественно сравнивали образцы, в которых была выявлена экспрессия исследуемых маркеров (рис. 1). Было выявлено, что величина экспрессии *NKX2-2* в позитивных и негативных образцах достоверно не различается ($p=0,95$). Экспрессия *STEAP1* в позитивных образцах была достоверно выше, чем в негативных и в контрольных ($p<0,01$ и $p=0,01$ соответственно), тогда как в двух последних группах достоверно не различалась ($p=0,96$). Нормализованная величина экспрессии гена *CCND1* в позитивных образцах была выше, чем в негативных ($p<0,01$), но не отличалась от величины в контрольной группе ($p=0,07$).

Для определения изменений экспрессии маркеров во время терапии сравнивали экспрессию *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* в образцах, взятых на момент первичной диагностики, и образцах, полученных во время терапии (рис. 2.). Экспрессия *NKX2-2* и *CCND1* во время лечения оставалась стабильной ($p=0,16$ и $p=0,13$ соответственно), тогда как экспрессия *STEAP1* в ходе терапии достоверно снижалась ($p=0,01$).

Так как мРНК части исследуемых маркеров была выявлена в негативных образцах и образцах пациентов контрольной группы, для определения порогового значения величины экспрессии генов *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* был проведен ROC-анализ. ROC-кривые представлены на рис. 3.

Выявлено, что все исследованные маркеры обладают статистически значимой диагностической ценностью при разделении позитивных и негативных образцов (во всех случаях $p<0,001$). Результаты сравнения ROC-кривых представлены в табл. 5.

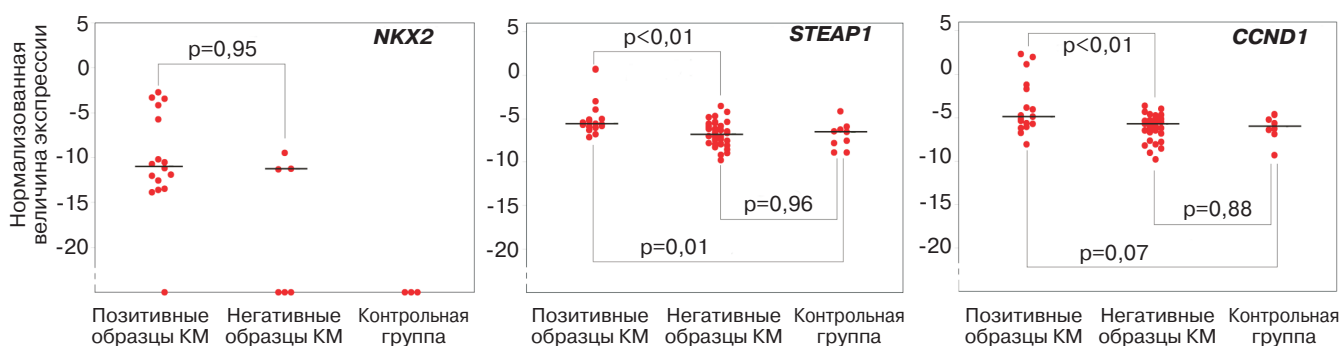


Рис. 1. Нормализованная величина экспрессии исследуемых маркеров (горизонтальная линия соответствует медиане) в позитивных и негативных образцах КМ больных СЮ/ПНЭО, а также образцах КМ пациентов без злокачественных опухолей (контрольная группа)

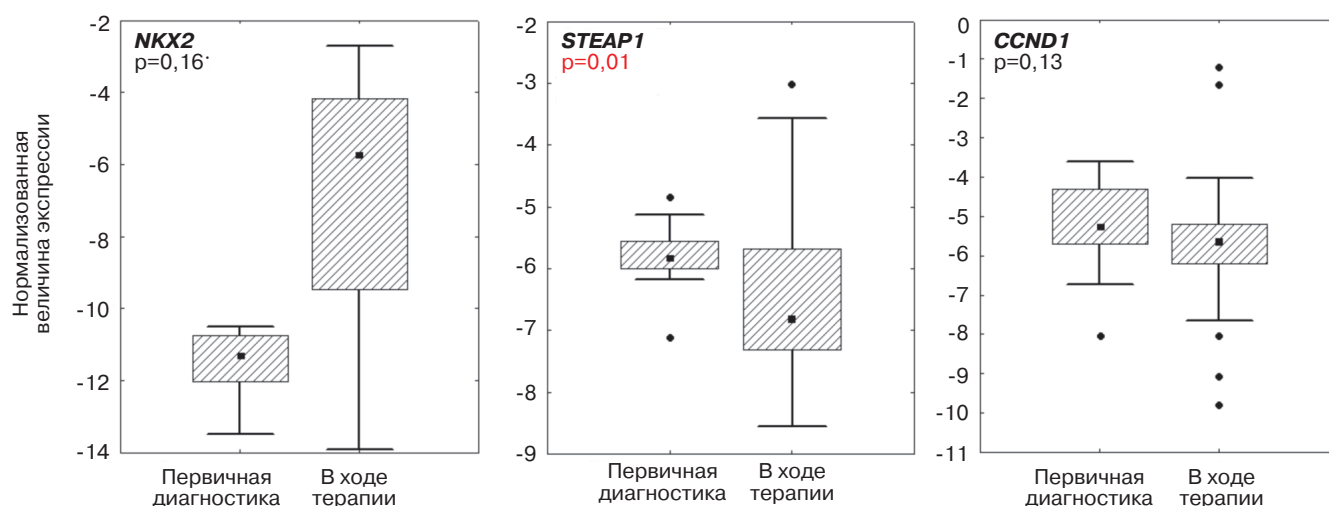


Рис. 2. Сравнение нормализованной величины экспрессии исследуемых маркеров в позитивных образцах КМ больных СЮ/ПНЭО на этапе первичной диагностики и в ходе терапии

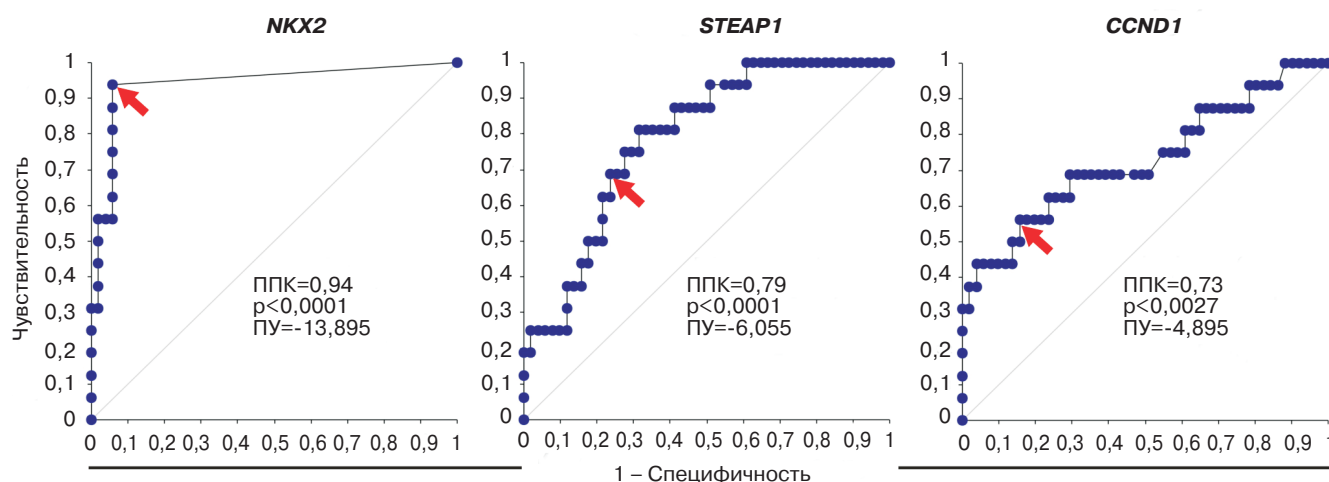


Рис. 3. ROC-кривые экспрессии генов *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1*, пороговый уровень обозначен стрелкой

Таблица 5. Результаты сравнения ROC-кривых

	<i>NKX2-2</i> (ППК=0,94)	<i>STEAP1</i> (ППК=0,79)
<i>STEAP1</i> (ППК=0,79)	$p=0,012$	—
<i>CCND1</i> (ППК=0,73)	$p=0,003$	$p=0,401$

На основании анализа ROC-кривых были определены ПУ экспрессии, которые для *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* составили $-13,895$; $-6,055$; $-4,895$ соответственно. В табл. 6 представлены результаты исследования экспрессии исследованных генов в позитивных и негативных образцах больных СЮ/ПНЭО.

В двух цитологически-негативных образцах КМ, полученных от одного пациента в момент диагностики рецидива ПНЭО, при исследовании мРНК химерных генов был выявлен атипичный транскрипт *EWS-ERG* (рис. 4). Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продукта позволило идентифицировать составные части химерного гена: *EWS* экзон 9 – *ERG* экзон 7, тогда как наиболее частый вариант транскрипта *EWS* экзон 7 – *ERG* экзон 6. В обоих случаях была выявлена экспрессия гена *NKX2-2*, превосходящая пороговый уровень.

Во всех 20 образцах КМ больных, у которых в материале первичной опухоли перестройки гена

Таблица 6. Результаты определения экспрессии генов-маркеров в позитивных и негативных образцах КМ больных СЮ/ПНЭО

	<i>NKX2-2</i>		<i>STEAP1</i>		<i>CCND1</i>	
	Выше ПУ	Ниже ПУ	Выше ПУ	Ниже ПУ	Выше ПУ	Ниже ПУ
Позитивные образцы	16	0	13	4	9	8
Негативные образцы	3	0	14	28	6	36

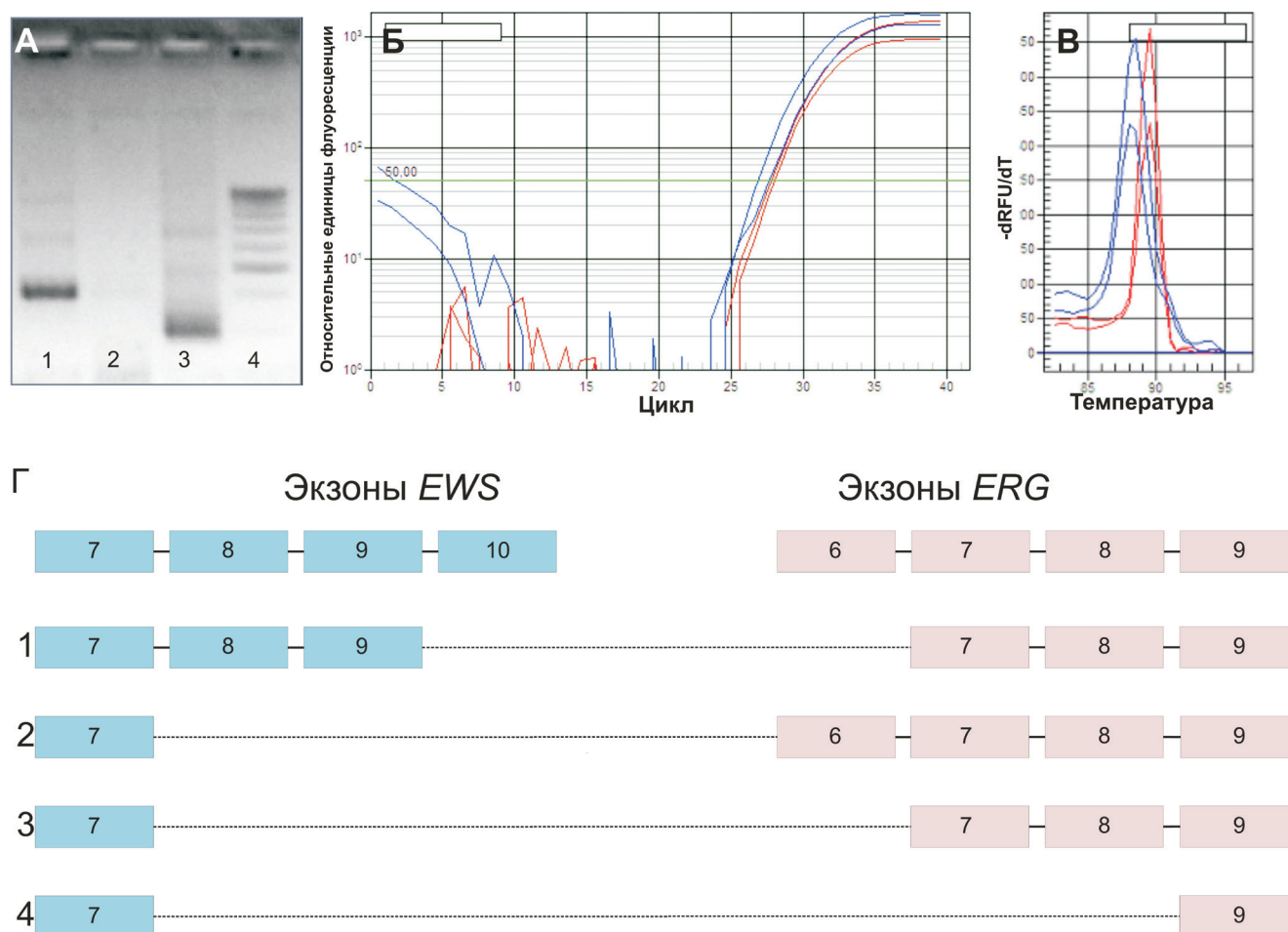


Рисунок 4. Способы выявления и механизм образования химерных транскриптов *EWS-ERG*.

а. Выявление химерных транскриптов методом гнездовой ПЦР: 1 – атипичный вариант химерного гена *EWS* (экзон 9) – *ERG* (экзон 7); 2 – отрицательный контроль; 3 – наиболее частый вариант химерного гена *EWS* (экзон 7) – *ERG* (экзон 6); 4 – маркер молекулярной массы; б. Выявление химерных транскриптов методом ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBRgreen (Синтол, Россия): красные кривые соответствуют химерному гену *EWS* (экзон 7) – *ERG* (экзон 6), синие – *EWS* (экзон 9) – *ERG* (экзон 7); в. Кривые плавления ПЦР продуктов, соответствующих различным вариантам химерного гена *EWS-ERG*: красные кривые соответствуют химерному гену *EWS* (экзон 7) – *ERG* (экзон 6), температура плавления 89,5 °С, синие – *EWS* (экзон 9) – *ERG* (экзон 7), температура плавления 88,0 °С; г. Механизм образования различных вариантов химерного гена *EWS-ERG*: 1 – атипичный вариант химерного гена *EWS* (экзон 9) – *ERG* (экзон 7); 2, 3, 4 – описанные в литературе варианты *EWS* (экзон 7) – *ERG* (экзон 6), *EWS* (экзон 7) – *ERG* (экзон 7), *EWS* (экзон 7) – *ERG* (экзон 9) соответственно [25]

EWS не были выявлены, при цитологическом исследовании опухолевые клетки отсутствовали, что не позволило включить данные образцы в группу, по результатам которой делался вывод о диагностической ценности исследуемых генов-маркеров. В двух из 20 образцов была выявлена экспрессия гена *NKX2-2*, превышающая ПУ, в остальных образцах экспрессия *NKX2-2* отсутствовала. Матричная РНК генов *STEAP1* и *CCND1* определялась во всех образцах, однако только в одном из них нормализованная величина экспрессии данных генов была выше соответствующего ПУ.

Учитывая пороговые значения экспрессии анализируемых генов-маркеров, были рассчитаны

критерии диагностической значимости данных тестов, представленные в табл. 7.

Принимая во внимание высокие значения критериев диагностической значимости выявления мРНК гена *NKX2-2* в КМ, была проанализирована экспрессия данного гена в 9 образцах аутологических ПСК с целью возможного выявления контаминации трансплантата опухолевыми клетками. Независимо от наличия или отсутствия иммуномагнитной CD34⁺ селекции, экспрессия *NKX2-2* не была выявлена ни в одном случае.

Обсуждение

Выявление в КМ больных опухолями семейства СЮ экспрессии генов *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1*,

Таблица 7. Критерии оценки диагностической информативности определения генов-маркеров для выявления поражения КМ при СЮ/ПНЭО

Ген-маркер	ПЦПР	ПЦОР	ДЧ	Сп	ДЭТ
<i>NKX2-2</i>	0,889	0,976	0,941	0,952	0,949
<i>STEAP1</i>	0,483	0,900	0,824	0,643	0,695
<i>CCND1</i>	0,588	0,833	0,588	0,833	0,763

Примечание: ПЦПР — прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР — прогностическая ценность отрицательного результата, ДЧ — диагностическая чувствительность, Сп — специфичность, ДЭТ — диагностическая эффективность теста.

по данным литературы, является надежным маркером поражения КМ и ассоциировано с достоверно более низкими показателями общей выживаемости больных и выживаемости без метастазирования. При этом данная зависимость показана как для индивидуального использования каждого маркера, так и для диагностической панели, включающей все три вышеупомянутых гена [4]. В нашем исследовании сходные результаты были получены только для гена *NKX2-2*: его экспрессия отсутствовала во всех образцах КМ пациентов без злокачественных опухолей, тогда как в клеточной линии SK-N-MC была высокой. Матричная РНК генов *STEAP1* и *CCND1* была выявлена во всех проанализированных образцах КМ, включая образцы контрольной группы. Аналитическая чувствительность определения экспрессии генов *NKX2-2*, *STEAP1* и *CCND1* составила 1×10^{-6} , что соответствует чувствительности метода выявления химерного транскрипта и значительно превышает предел чувствительности цитологического исследования.

Выбор в качестве критериев позитивности образцов КМ данных цитологического исследования и гнездовой ПЦР позволил сравнить диагностическую информативность каждого исследуемого маркера. Экспрессия гена *NKX2-2* была выявлена в большинстве позитивных образцов КМ больных СЮ/ПНЭО и только в 2 негативных. *NKX2-2* показал высокие значения всех критериев оценки диагностической эффективности исследования. При сравнении ROC-кривых было выявлено, что диагностическая эффективность *NKX2-2* значительно превосходит *STEAP1* и *CCND1*. В двух образцах КМ больного ПНЭО с атипичным химерным транскриптом *EWS-ERG*, а также в двух образцах КМ больных без перестроек *EWS* была обнаружена экспрессия *NKX2-2*. В подобных случаях, когда использование надежного метода выявления поражения КМ — выявления химерных генов — оказывается невозможным, использование молекулярных маркеров, основанных на определении экспрессии генов, специфичных для опухоли, может оказать неоценимую помощь.

В рамках настоящей работы было показано, что гены *STEAP1* и *CCND1* в высокой степени экспрессированы как в клетках опухоли, так и в нормальных гемопоэтических клетках. В результате критерии диа-

гностической информативности данных маркеров низки, и их использование для диагностики поражения КМ при СЮ/ПНЭО, а также для мониторинга минимальной метастатической болезни нецелесообразно. Кроме того, было отмечено, что экспрессия гена *STEAP1* в процессе терапии снижается.

Объединение исследованных маркеров в диагностическую панель, как было предложено Cheung и соавторами, на наш взгляд, неоправданно, поскольку только ген *NKX2-2* обладает высокими диагностическими характеристиками и позволяет достоверно выявлять опухолевые клетки в КМ. Вероятно, *NKX2-2* может быть применен для контроля чистоты препаратов ПСК для аутологичной трансплантации. Однако подтвердить это в работе не удалось вследствие малого количества исследованных образцов ПСК и/или отсутствия экспрессии в них анализируемого гена.

Выводы

1. Для выявления поражения КМ при опухолях семейства СЮ использование гена *NKX2-2* обладает высокой диагностической эффективностью, не уступающей выявлению химерных транскриптов методом гнездовой ПЦР.

2. Данный маркер может быть применен для оценки поражения КМ у больных без выявленных перестроек гена *EWS*, а также с наличием атипичных химерных генов.

3. Экспрессия *NKX2-2* остается стабильной в ходе терапии СЮ/ПНЭО.

4. *STEAP1* и *CCND1* обладают значительно меньшей диагностической эффективностью, и поэтому их применение для выявления поражения КМ вряд ли целесообразно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Н.М. Саркома Юинга. В кн.: «Клинические лекции по детской онкологии». Под ред. Л.А. Дурнова. М., «Медицинское информационное агентство». 2004, с. 251-270.
2. Peter M., Magdelenat H., Michon J. et al. Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Br. J. Cancer. 1995, No. 72, p. 96-100.
3. Zoubek A., Ladenstein R., Windhager R. et al. Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing

- tumor patients by RT-PCR: A preliminary evaluation. *Int. J. Cancer*. 1998, No. 79, p. 56-60.
4. Cheung I., Feng Y., Danis K. et al. Novel Markers of Subclinical Disease for Ewing Family Tumors from Gene Expression Profiling. *Clin. Cancer Res.* 2007, No. 13 (23), p. 6978-6983.
 5. Cheung I.Y., Cheung N.K.V. Quantification of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin. Cancer Res.* 2001, No. 7, p. 1698-1705.
 6. Aurias A., Rimbaut A., Buffe D. et al. Chromosomal translocation in Ewing's sarcoma. *N. Engl. J. Med.* 1983, No. 309, p. 496-497.
 7. Turc-Carel C., Philip I., Berger M.P. et al. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N. Engl. J. Med.* 1983, No. 309, p. 497-498.
 8. Sorensen P.H., Lessnick S.L., Lopez-Terrada D. et al. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat. Genet.* 1994, No. 6, p. 146-151.
 9. Jeon I.S., Davis J.N., Braun B.S. et al. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene*. 1995, No. 10, p. 1229-1234.
 10. Kaneko Y., Yoshida K., Handa M. et al. Fusion of an ETS-family gene, E1AF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosom Cancer*. 1996, No. 15, p. 115-121.
 11. Schleiermacher G., Peter M., Oberlin O. et al. Increased Risk of Systemic Relapses Associated With Bone Marrow Micrometastasis and Circulating Tumor Cells in Localized Ewing Tumor. *J. Clin. Oncol.* 2003, No. 21, p. 85-91.
 12. Muller H., Lukas J., Schneider A. et al. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994, No. 91, p. 2945-2949.
 13. Toyoda M., Shirato H., Nakajima K. et al. Jumonji down-regulates cardiac cell proliferation by repressing cyclin D1 expression. *Dev. Cell*. 2003, No. 5, p. 85-97.
 14. Briskin C., Ayyannan A., Nguyen C. et al. IGF-2 is a mediator of prolactin-induced morphogenesis in the breast. *Dev. Cell*. 2002, No. 3, p. 877-887.
 15. Fu M., Wang C., Li Z. et al. Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004, No. 145, p. 5439-5447.
 16. Ding Y.Q., Marklund U., Yuan W. et al. Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. *Nature Neurosci.* 2003, No. 6, p. 933-938.
 17. Sussel L., Kalamaras J., Hartigan-O'Connor D.J. et al. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development*. 1998, No. 125, p. 2213-2221.
 18. Hubert R.S., Vivanco I., Chen, E. et al. STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1999, No. 96, p. 14523-14528.
 19. Мисюрин А.В., Аксенова Е.В., Крутов А.А. и соавт. Молекулярная диагностика хронического миелолейкоза. *Гематология и трансфузиология*. 2007, № 2, с. 35-40.
 20. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 1993, No. 31, p. 561-577.
 21. Obuchowski N.A. ROC analysis. *Am. J. Roentgenol.* 2005, No. 184, p. 364-372.
 22. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988, v. 44, p. 837-845.
 23. Weinstein S., Obuchowski N.A., Lieber M.L. Clinical evaluation of diagnostic tests. *Am. J. Roentgenol.* 2005, No. 184, p. 14-19.
 24. Jarvik J.G. The research framework. *Am. J. Roentgenol.* 2001, v. 176, p. 873-877.
 25. Kojima T., Asami S., Chin M. et al. Detection of Chimeric Genes in Ewing's Sarcoma and Its Clinical Applications. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, No. 25 (8), p. 991-994.

Статья поступила 30.09.2012 г., принята к печати 20.10.2012 г.
Рекомендована к публикации А.А. Феденко

APPLICATION OF *NKX2-2*, *STEAP1* AND *CCND1* GENES EXPRESSION FOR BONE MARROW INVOLVEMENT DETECTION IN PATIENTS WITH EWING FAMILY TUMORS

Druy A.E.^{1,2,3}, Tsauro G.A.^{1,3}, Popov A.M.^{1,3}, Demina A.S.^{1,3}, Riger T.O.^{1,3}, Tuponogov S.N.¹, Shorikov E.V.^{1,3}, Savelyev L.I.^{1,2,3}, Tsvirenko S.V.^{1,2}, Fechina L.G.^{1,3}

¹ Regional Children's Hospital N1, Ekaterinburg, Russia

² Ural State Medical Academy, Ekaterinburg, Russia

³ Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia

Key words: Ewing family tumors, bone marrow, real-time quantitative PCR, *NKX2-2*

We estimated the applicability of *NKX2-2*, *STEAP1* and *CCND1* genes expression evaluation by real-time PCR for bone marrow (BM) involvement detection in Ewing family tumors (EFT) patients. Expression of molecular markers were analyzed in 59 BM samples from 6 EFT patients with *EWS* gene rearrangements, in 20 BM samples from 5 patients without detected rearrangements, in 8 BM samples from 8 patients without malignancies, in SK-N-MC cell line and in 9 samples of the peripheral blood stem cells. BM samples were considered true positive in case of *EWS-FLI1* or *EWS-ERG* fusion gene transcript presence or tumor cells in BM smears. *NKX2-2* expression was not revealed in normal BM while was present in positive BM samples and was not found in the majority of negative BM samples. Expression of *NKX2-2* and *CCND1* remained stable during EFT treatment, while *STEAP1* expression was downmodulated. ROC-analysis revealed threshold levels of expression for each marker which were used for diagnostic values calculation. *NKX2-2* demonstrated high positive and negative predictive values (0,889 и 0,976 respectively) for EFT marrow disease detection and monitoring. Overall correct prediction value achieved 0,949. *STEAP1* and *CCND1* assessment was not relevant for BM disease monitoring in EFT patients.