

Перспективы молекулярно-генетического мониторинга колоректального рака и некоторых других видов злокачественных новообразований человека

А.Р. Зарецкий^{1,2}, А.В. Белоусова², О.В. Дрозд², Д.А. Шагин^{1,2}*

¹ ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва

² ООО «Евроген Лаб», г. Москва

* Адрес для переписки: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, корп. 70, оф. 203

Тел: 8 (495) 988-40-86, факс: 8 (495) 988-40-85, e-mail: zaretsky@evrogen.ru

Введение. Фрагменты ДНК опухолевого происхождения могут быть обнаружены в различных биологических образцах онкологических больных, включая плазму крови, мочу, слюну и даже конденсат выдыхаемого воздуха. Качественный и количественный анализ опухолеспецифических ДНК может стать основой для минимально инвазивного скрининга злокачественных опухолей, оценки радикальности проведенного лечения, а также для мониторинга динамики опухолевого процесса и изменения профиля лекарственной чувствительности опухолевых клеток в ходе терапии. Однако мутантные и гиперметилированные фрагменты ДНК опухолевого происхождения представлены в этих образцах, во-первых, в предельно малом количестве, а во-вторых, на фоне многократно большего количества фрагментов ДНК «дикого типа», попадающих туда из неизмененных органов. Соответственно, основой для неинвазивной генодиагностики рака могут стать только методы с высокой чувствительностью и избирательностью.

Цель. Разработать стратегию создания тест-систем для неинвазивной генодиагностики в онкологии.

Материалы и методы. Были систематизированы данные научной литературы об имеющихся технологиях мутационно-специфического анализа и уровне их чувствительности, специфичности и воспроизводимости. На основе систематизированных данных выбирались наиболее перспективные технологии, в которые далее вносились необходимые модификации и дополнения. Тестирование вариантов технологии осуществлялось с помощью ПЦР в режиме реального времени, результаты которой проверялись анализом кривой плавления, электрофорезом в ПААГ и секвенированием продуктов ПЦР. Использовались панели валидированных контрольных образцов ДНК.

Результаты. По результатам анализа литературных данных наиболее перспективными методами были признаны т. н. «proof-reading PCR» и «wild-type blocking PCR». Применимыми для неинвазивной генодиагностики рака могут быть методы с избирательностью $\geq 1:100$; однако для осуществления таких задач, как скрининг, необходима избирательность порядка 1:100000. Разработанные нами тест-системы для анализа мутаций в генах *K-Ras* и *B-Raf*, использующие

метод «wild-type blocking PCR», обеспечивают избирательность порядка 1:200 при использовании ПЦР в режиме реального времени и порядка 1:2000 при использовании ПЦР с последующим прямым секвенированием продуктов ПЦР по Сэнгеру. Чувствительность данных методик в обоих случаях составляет около 10 копий в реакции. Методики отличаются также хорошей воспроизводимостью на ДНК из различных биологических образцов.

Заключение и выводы. Разработанные нами тест-системы позволяют решать некоторые задачи неинвазивной генодиагностики в онкологии. Для получения более универсальных тест-систем необходимо значительное увеличение избирательности анализа. Вопреки мнению ряда авторов, мы полагаем, что добиться такого увеличения путем модификации условий реакции почти невозможно. В докладе будут описаны подходы к практически неограниченному увеличению избирательности мутационного анализа с применением высокопроизводительных генетических анализаторов, а также будут сформулированы требования к биологическому материалу для такого высокоизбирательного анализа и методологические предосторожности, необходимые при интерпретации его результатов.