

УДК 328

ДИАГНОСТИКА РАКА ТОЛСТОЙ КИШКИ НА ОСНОВЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МОЛЕКУЛ ДНК**Г.М. Бутрович, Е.Д. Мирлина, О.А. Вострюхина***Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт, Гатчина, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

Колоректальный рак (КРР, рак толстой кишки) – злокачественная опухоль из элементов эпителия толстой кишки. КРР является четвертой ведущей причиной смертности от рака у мужчин и третьей ведущей причиной у женщин во всем мире (Jemal et al., 2011). Частота встречаемости КРР и явная зависимость успешного излечения от раннего обнаружения заболевания оправдывают регулярное обследование здоровых людей, особенно входящих в группу риска. Вследствие этого разработка неинвазивных методов ранней диагностики КРР, становится все более актуальной. В фекалиях человека обнаруживается небольшое количество клеток кишечного эпителия как следствие физиологического слущивания при прохождении каловых масс.

Возможность выделять ДНК человека из образцов фекалий и проводить ее анализ была продемонстрирована за два последних десятилетия достаточно многочисленными группами исследователей (Carozzi et al., 2013; Imperiale et al., 2014). Колоректальные раковые клетки наряду с нормальными попадают в стул человека, представляя таким образом материал для исследования. Bounton в своей работе показал, что фрагменты ДНК, выделенные из стула больных с колоректальными опухолями, имели большую молекулярную массу нежели фрагменты, полученные из стула здоровых индивидуумов (Bounton et al., 2003). Следовательно, анализ целостности фрагментов ДНК, выделенной из образцов стула, предоставляет большие возможности для диагностики КРР.

Цель работы – разработка способа ранней неинвазивной диагностики колоректального рака на основе анализа целостности молекул ДНК, выделенных из фекалий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов. Образцы фекалий были предоставлены ПСПБГМУ им. И.П. Павлова и ФГБУ "НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова". Образцы были получены у 103 человек, из них 79 пациентов с КРР и 24 здоровых добровольца (контрольная группа). Около 5 г стула было отобрано у каждого индивидуума. Сразу после дефекации пробы помещались в герметичные пластиковые контейнеры, содержащие 1 мл 0,5 М буфера ЭДТА и хранились при +4° С. Выделение геномной ДНК производили в промежутки от 6 до 24 часов после отбора пробы. Для пациентов с КРР были предоставлены демографические данные, диагноз был подтвержден гистологически и получены клинко-патологоанатомические данные опухолей. Наличие или отсутствие опухоли у пациентов и контрольной группы было установлено методом колоноскопии.

Выделение ДНК. Выделение геномной ДНК производили с использованием набора «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва). ПЦР-анализ. С целью проверки успешности выделения ДНК и отсутствия ингибирования ПЦР предварительно проводили амплификацию двух коротких фрагментов длиной менее 200 н.п. из разных участков генома: фрагмент гена *TP53* длиной 141 н.п. и фрагмент гена *VLM* длиной 153 н.п. ПЦР проводили в стандартных условиях с использованием нуклеозидтрифосфатов фирмы «Медиген» (Новосибирск), праймеров производства НПО «Синтол» (Москва) и Таq-полимеразы фирмы НПО «СибЭнзим» (Новосибирск). Для оценки целостности геномной ДНК методом ПЦР-анализа использовали два протяженных фрагмента: фрагмент гена *TP53* длиной 800 н.п. (*TP53 800*) и фрагмент гена *MLH1* длиной 2340 н.п. (*MLH1 2340*). Полимеразную цепную реакцию проводили при помощи набора «Encyclo Plus PCR kit» (ЗАО «Евроген, Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

Визуализация полученных результатов. Для визуализации полученных продуктов амплификации проводили одномерный электрофорез в 6 %-м ПААГ или 1 %-м агарозном геле с последующим окрашиванием нитратом серебра или бромидом этидия.

Статистический анализ. Для анализа данных использовали программу Graphpad Instat. Различия между группами считали достоверными на уровне 95 % вероятности при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После отбора образцов фекалий пациентов содержащаяся в них ДНК, как правило, деградирует, что может снизить эффективность молекулярного анализа. Было показано, что добавление стабилизирующего буфера в образцы сразу после дефекации предотвращает деградацию ДНК в течение нескольких дней и повышает эффективность молекулярных тестов. Нами предложены следующие условия хранения и транспортировки образцов фекалий, обеспечивающие максимальную их сохранность – от 6 часов до 3-х суток в 0,5 М буфере ЭДТА при +4 °С и рН = 8.

Поскольку геномная ДНК в норме при прохождении через желудочно – кишечный тракт расщепляется до фрагментов 190–210 н.п., то при оптимальных условиях для ПЦР фрагменты длиной 141 и/или 153 н.п. обнаруживаются в фекалиях как здоровых индивидуумов, так и больных колоректальным раком. Полученные короткие ПЦР-фрагменты свидетельствуют о выделении достаточного количества ДНК для проведения дальнейших экспериментов (амплифицирования протяженных фрагментов) и об отсутствии ингибирования ПЦР-реакции. Интенсивность электрофоретических зон коротких фрагментов ДНК визуально практически не отличалась у группы больных и контрольной группы.

На следующем этапе методом ПЦР-анализа выявляли протяженные фрагменты ДНК, по присутствию которых судили о наличии у пациента КРР. При подборе протяженных фрагментов ставили задачу охватить оба основных генетических пути развития КРР, в которых задействованы две разные группы генов. Соответственно, предполагали использовать фрагменты, которые принадлежат генам, относящимся к разным группам.

Наиболее оптимальными были признаны фрагмент гена TP53, включающий 7, 8 и 9 экзоны (TP53 800) и фрагмент гена MLH1 (MLH1 2340). Данные фрагменты ДНК были обнаружены в стуле 60 из 79 пациентов с КРР, в том числе TP53 800 – в 51 случаях, MLH1 2340 – в 49 случаях, а оба фрагмента выявлены в стуле 36 пациентов. В контрольной группе протяженные фрагменты ДНК в стуле отсутствовали. Использование двух фрагментов из разных участков генома позволило повысить достоверность полученных результатов. Чувствительность и специфичность метода с использованием комбинации из фрагментов двух генов составили, соответственно, 76 и 100 % ($P < 0,0001$); общая чувствительность была выше по сравнению с каждым отдельным фрагментом.

Был проведен анализ чувствительности данного метода в зависимости от стадии заболевания, от локализации опухоли (для разных отделов толстой кишки), а также в зависимости от клинико-патологоанатомических характеристик новообразования (эндофитного либо экзофитного роста опухоли, наличия в ней некроза, степени дифференцировки опухоли). С уровнем статистической достоверности более 95 % не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода для пациентов с I–II (82 %) и III–IV (76 %) стадией, что демонстрирует возможности метода для ранней диагностики КРР.

Показано, что чувствительность метода для прямой кишки по сравнению с другими отделами толстой кишки достоверно выше – 85 против 62,5 % ($P = 0.0314$). Принимая во внимание принцип действия рассматриваемого метода, результат ожидаемый, т. к. раковые клетки, происходящие из наиболее удаленных от анального отверстия отделов толстой кишки, находятся в просвете кишечника существенно большее время, чем клетки из прямой кишки и в большей степени подвергаются разрушительному действию ферментов, в результате чего их ДНК больше деградирует. Чувствительность метода диагностики КРР при выявленном в опухоли некрозе составила 89 %, а в отсутствие некроза – 69 %; эти различия статистически не являются достоверными ($P = 0.0562$), но можно говорить о заметной тенденции в повышении чувствительности при наличии некроза. Не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода в отношении опухолей с эндофитным или экзофитным ростом ($P = 0.4087$), а также в отношении опухолей с разной степенью дифференцировки.

ЛИТЕРАТУРА

- Jemal A. et al. Global cancer statistics // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – V.61. – P.69–90.
- Carozzi F.M. and Sani C. Fecal Collection and Stabilization Methods for Improved Fecal DNA Test for Colorectal Cancer in a Screening Setting // *Journal of Cancer Research.* – 2013.
- Imperiale T.F., Ransohoff D.F., Itzkowitz S.H. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening // *N Engl J Med.* – 2014. – V.370. – P.1287–1297.
- Boynton K.A. et al. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. // *Clin Chem.* – 2003. – V.49. – P.1058–1065.