

© Коллектив авторов, 2014 г.
УДК [616.33+616.34]-006.6:612.361:577.124.23-074

**Г. М. Бутрович, Е. Д. Мирлина,
Р. В. Грозов, И. Г. Хабарова,
О. А. Вострюхина**

ПЦР-АНАЛИЗ ФЕКАЛЬНОЙ ДНК ДЛЯ СКРИНИНГА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»; Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний и приводит к высокой смертности среди пациентов. Однако при выявлении на первой стадии КРР излечим в 90 % случаев (J. Olson, 2005), из чего следует, что ранняя диагностика КРР чрезвычайно важна. На сегодняшний день уже нет сомнений в необходимости скрининга населения, особенно людей, входящих в группу риска, на выявление КРР.

Фиброколоноскопия (ФКС) сегодня является основным тестом, который используется для установления или исключения колоректальной патологии. Однако в качестве скринингового теста этот метод не всегда применим из-за своей дороговизны, неудобств, связанных с необходимостью тщательной подготовки кишечника пациента для получения достоверных результатов, из-за возможности осложнений.

Широко распространенным методом диагностики КРР является анализ кала на скрытую кровь. Это недорогой, относительно простой неинвазивный тест, основным недостатком которого является невысокая чувствительность и специфичность, т. е. получение большого количества как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов.

Предложенный ниже неинвазивный метод диагностики КРР основан на анализе методом ПЦР ДНК, выделенной из фекалий пациента.

В фекалиях человека обнаруживается небольшое количество клеток кишечного эпителия как следствие физиологического слущивания. Клетки кишечного эпителия быстро обновляются. Отшелушенные эпителиальные клетки при прохождении через кишечный тракт могут полностью или частично разрушаться под действием ферментов, ДНК этих клеток деградирована.

Несколько иная картина наблюдается у пациентов с колоректальными опухолями. Колоректальные раковые клетки, наряду с нормальными, по-

дают в стул человека, причем у пациентов с новообразованиями кишечника количество ДНК в кале может быть даже увеличено по сравнению с таковыми у здоровых лиц. Значительное количество ДНК опухолевых клеток может сохранять свою стабильность в связи с нарушением механизма апоптоза или из-за устойчивости подобных клеток к различным деградирующим ферментам.

Показано (К. А. Boynton, 2003), что фрагменты ДНК, выделенные из стула больных с колоректальными опухолями, имеют большую молекулярную массу, нежели фрагменты, полученные из стула здоровых индивидуумов. Следовательно, анализ целостности фрагментов ДНК, выделенной из образцов стула, предоставляет большие возможности для диагностики КРР.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы стула были получены от пациентов хирургического отделения ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. В исследовании участвовали 48 человек, из них 31 пациент с КРР и 17 человек, не имеющих новообразований желудочно-кишечного тракта. Наличие или отсутствие опухоли было установлено методом ФКС. Были получены демографические (в том числе и для контрольной группы) и клиничко-патологоанатомические данные пациентов. Все опухоли были гистологически охарактеризованы. Выделение геномной ДНК производили из 1 мл образца стула с использованием кита «ДНК-сорб-В».

ПЦР-анализ. Производили амплификацию двух коротких фрагментов длиной менее 200 н.п. (фрагменты генов *BLM* и *TP53*). Для анализа целостности ДНК был выбран фрагмент длиной 800 н.п., содержащий 7, 8 и 9 экзоны гена *TP53*.

Прямой праймер:

5'-GCCTCATCTTGGGCCTGTGTTATCTC-3';

обратный праймер:

5'-CCACTTGATAAGAGGTCCCAAGACTT-3'.

Для визуализации продуктов ПЦР проводили электрофорез в полиакриламидном геле.

Статистический анализ проводили с использованием программы «Graphpad Instat» по методу Фишера. Различия между группами считали достоверными на уровне 95 %-й вероятности при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью проверки выделения ДНК и отсутствия ингибирования ПЦР предварительно амплифицировали два коротких фрагмента длиной менее 200 н.п. Данные электрофоретического анализа полученных фрагментов свидетельствуют о выделении достаточного количества ДНК для проведения дальнейших экспериментов и об отсутствии ингибирования ПЦР-реакции.

Фрагмент ДНК длиной 800 н.п. был обнаружен в стуле 22 из 31 пациента с КРР. В контрольной группе такие фрагменты ДНК в стуле отсутствовали.

58 % пациентов составляли женщины и 42 % — мужчины. У 30 пациентов были аденокарциномы и у 1 — злокачественный карциноид. 80 % пациентов имели умеренно-дифференцированные опухоли, 10 % — низкодифференцированные и 10 % — высокодифференцированные опухоли.

Некроз опухоли был обнаружен у 36 % пациентов. 61 % пациентов имели экзофитную и 39 % — эндофитную форму роста опухоли.

Демографические и клинико-патологоанатомические данные пациентов были проанализированы при помощи программы «Graphpad InStat». Ни для одной выборки не было найдено статистически достоверной корреляции с наличием или отсутствием протяженных фрагментов ($p > 0,05$).

С уровнем статистической достоверности более 95 % не выявлено статистически значимых различий ($p = 1$) между чувствительностью метода для пациентов с I — II (73 %) и III — IV (70 %) стадиями, что позволяет предположить возможность применения метода для ранней диагностики КРР.

Ранее в литературе показана адекватность анализа повреждений фекальной ДНК и ДНК из опухолевых клеток. Эти данные позволили разработать ряд диагностических методик, основанных на анализе фекальной ДНК. К их числу относятся, например, следующие: биочип от *Randox* (позволяющий анализировать 28 мутаций в 4 генах); набор Pre-GenPlus от *Exact Sciences* (анализ 23 мутаций в 3 генах, маркера микросателлитной нестабильности и анализ целостности ДНК), набор на основе двух маркеров (поиск мутаций в гене *VIM* и анализ целостности ДНК по двум участкам) (S. Itzkowitz, 2008). Использование нескольких маркеров повышает чувствительность и специфичность теста, но увеличивает его стоимость и время выполнения.

Метод протяженных фрагментов, основанный только на анализе целостности фекальной ДНК, выгодно отличается от вышеописанных быстротой, дешевизной и возможностью проводить неинвазивную диагностику КРР в стандартной ПЦР-лаборатории. В предлагаемом нами методе в качестве маркера используется целостность протяженного фрагмента гена *TP53* размером 800 н.п., чувствительность данного теста (71 %) превышает таковую у используемых в мировой практике аналогов, также основанных на анализе целостности одиночного

фрагмента ДНК, специфичность составляет 100 %. Кроме того, чувствительность метода не имеет значимых различий для пациентов с разными стадиями заболевания, что позволяет использовать его, в том числе, и для ранней диагностики КРР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод неинвазивной ПЦР-диагностики колоректального рака на основе анализа целостности ДНК из стула пациента. Чувствительность и специфичность метода составляют, соответственно, 71 и 100 %. Кроме того, продемонстрирована применимость метода для ранней диагностики КРР. Предполагается, что данный метод может быть использован как тест для популяционного скрининга.

РЕЗЮМЕ

Г. М. Бутрович, Е. Д. Мирлина, Р. В. Грозов, И. Г. Хабарова, О. А. Вострухина

ПЦР-анализ фекальной ДНК для скрининга колоректального рака

Представлена разработка процедуры неинвазивной диагностики колоректального рака на основе анализа целостности ДНК, извлеченной из стула пациента. Методами полимеразной цепной реакции и последующего электрофореза в полиакриламидном геле в стуле больных раком кишечника были выявлены протяженные фрагменты ДНК размером 800 н.п., в то время как при анализе ДНК из стула лиц контрольной группы обнаруживали лишь короткие фрагменты ДНК, размером менее 200 н.п. Чувствительность и специфичность анализа составили соответственно 71 ($p < 0,0001$) и 100 % ($p < 0,0001$).

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы, колоректальный рак, полимеразная цепная реакция, протяженные фрагменты ДНК.

SUMMARY

G. M. Butrovich, T. D. Mirlina, R. V. Grozov, I. G. Khabarova, O. A. Vostrukhina

Stool-based PCR test for colorectal cancer screening

The research represents working out of non-invasive colorectal cancer screening based on DNA integrity testing of patient's fecal. Polymerase chain reaction method and the following polyacrylamide gel electrophoresis in fecal of patient with colorectal cancer detected long DNA fragments which size was 800 n.p. But the same stool DNA testing of control group detected just short DNA fragments which size was less than 200 n.p. The sensitivity and specificity of the analysis was 71 ($p < 0,0001$) and 100 % ($p < 0,0001$).

Key words: molecular and genetic methods, colorectal cancer, polymerase chain reaction, long DNA fragments.