

12. Oral O., Cıkım T., Zuvin M., Unal O., Yagci-Acar H., Gozuacik D. et al. Effect of varying magnetic fields on targeted gene delivery of nucleic acid-based molecules. *Ann. Biomed. Eng.* 2015; 43 (11): 2816–26.
13. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles.* 2014; 3: 1–14.
14. Doherty G.J., McMahon H.T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78: 857–902.
15. Hattori T., Uchiyama T., Toibana T., Takatsuki K., Uchino H. Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. *Blood.* 1981; 58: 645–7.
16. Waldmann T.A. The role of the multichain IL-2 receptor complex in the control of normal and malignant T-cell proliferation. *Environ Health Perspect.* 1987; 75: 11–5.
17. Ledbetter J.A., Imboden J.B., Schieven G.L., Grosmaire L.S., Rabinovitch P.S., Lindsten T. et al. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood.* 1990; 75 (7): 1531–9.
18. Mehta K., Shahid U., Malavasi F. Human CD38, a cell surface protein with multiple functions. *FASEB J.* 1996; 10 (12): 1408–17.
19. Sancho D., Gomez M., Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005; 26: 136–40.
20. Freedman A.S., Nadler L.M. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 1991; 5: 871–89.
21. Brint E., O'Callaghan G., Houston A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 2013; 70 (21): 4085–99.
22. Tatewaki M., Yamaguchi K., Matsuoka M., Ishii T., Miyasaka M., Mori S. et al. Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 tax. *Blood.* 1995; 86 (8): 3109–17.
23. Wang X., Ragupathy V., Zhao J., Hewlett I. Molecules from apoptotic pathways modulate HIV-1 replication in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 414 (1): 20–4.

Поступила 30.01.17

Принята к печати 15.02.17

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.348-006.04:577.21.08

Бутрович Г.М.^{1,2}, Мирлина Е.Д.^{1,2}, Вербенко В.Н.^{1,2}, Хабарова И.Г.³, Вострюхина О.А.^{1,2}

РАЗРАБОТКА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА ОСНОВЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ФЕКАЛИЙ ПАЦИЕНТА

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» ФГБУ «ПИАФ», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина;

²ФГБОУ ПО «СПбГПУ», 195251, Санкт-Петербург;

³ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург

Представлена разработка процедуры диагностики колоректального рака (КРР) на основе анализа целостности фекальной ДНК. Образцы стула были отобраны у 91 человека, из них 60 с КРР, 24 здоровых добровольца (контрольная группа) и 7 больных с доброкачественными опухолями. Для оценки целостности геномной ДНК методом ПЦР-анализа использовали два протяженных фрагмента – участки генов TP53 и MLH1. В стуле 47 пациентов с КРР выявлены протяженные фрагменты ДНК, в то время как при анализе ДНК из стула людей контрольной группы обнаруживали лишь короткие фрагменты ДНК размером менее 200 н. п.

Разработан метод неинвазивной ПЦР-диагностики КРР, чувствительность и специфичность которого составили соответственно 78 и 100% ($p < 0,0001$). Чувствительность метода не имеет значимых различий для пациентов с разными стадиями заболевания, что позволяет использовать его для ранней диагностики КРР.

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

Для цитирования: Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вербенко В.Н., Хабарова И.Г., Вострюхина О.А. Разработка ПЦР-диагностики колоректального рака на основе целостности ДНК, выделенной из фекалий пациента. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (6): 359-362. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-359-362>

Butrovich G.M.^{1,2}, Mirulina E.D.^{1,2}, Verbenko V.N.^{1,2}, Habarova I.G.³, Vostryuhina O.A.^{1,2}

THE DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION DIAGNOSTIC OF COLORECTAL CANCER BASED ON DNA INTEGRITY SEPARATED FROM FECES OF PATIENT

¹The National research center "The Kurchatovskii" Institute" of the B.P. Konstantinov St. Petersburg Nuclear Physics Institute, 188300, Gatchina, Russia

²The Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251 St. Petersburg, Russia

³The I.P. Pavlov first Sankt-Pereburgskii state medical university of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

The article presents procedure of diagnostic of colorectal cancer on the basis of analysis of integrity of fecal DNA. The samples of stool were picked out in 91 patients and out of them: 60 patients with colorectal cancer, 24 healthy volunteers (control group) and

Для корреспонденции: Вострюхина Ольга Альбертовна, канд. хим. наук, доц., ст. науч. сотр. отд-ния молекулярной и радиационной биологии ФГБУ «ПИАФ»; e-mail: oavostr@bpc.spbstu.ru

7 patients with benign tumors. The evaluation of integrity of genome DNA using technique of polymerase chain reaction analysis specified involvement of two long fragments - sites of genes TP53 and MLH1. In stool of 47 patients with colorectal cancer the long fragments of DNA were detected while analysis of DNA from stool of individuals from control group detected only short fragments of DNA with size less than 200 np.

The technique of non-invasive polymerase chain reaction diagnostic of colorectal cancer was developed. The sensitivity and specificity of this technique made up to 78% and 100% ($p < 0.0001$). The sensitivity of technique has no significant differences for patients with different stages of disease that permits to apply it for early diagnostic of colorectal cancer.

Key words: *molecular genetic methods; colorectal cancer; polymerase chain reaction; extended fragments of DNA.*

For citation: *Butrovich G.M., Mirlina E.D., Verbenko V.N., Habarova I.G., Vostryuhina O.A. The development of polymerase chain reaction diagnostic of colorectal cancer based on DNA integrity separated from feces of patient. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (6): 359-362. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-359-362>*

For correspondence: *Vostryuhina O.A., candidate of chemical sciences, associate professor, senior researcher of the department of molecular and radiation biophysics. e-mail: oavostr@bpc.spbstu.ru*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support. The authors express their gratitude to research workers of the B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute B.P. Konstantinov and Yu.A. Romanova for their support in receiving biological samples and Yu.V. Kil for valuable methodological advices.*

Received 16.02.2017
Accepted 27.02.2017

Частота встречаемости КРР и явная зависимость успешного излечения от раннего обнаружения заболевания [1] оправдывают регулярное обследование здоровых людей, особенно входящих в группу риска. Вследствие этого разработана неинвазивных методов ранней диагностики КРР, пригодных для использования в скрининговых программах, становится все более актуальной.

Среди неинвазивных методов наиболее распространен тест на скрытую кровь в фекалиях. Однако чувствительность и специфичность этого метода недостаточны [2]. Кроме того, он мало информативен при выявлении опухолей на ранней стадии [3, 4].

Молекулярная диагностика на сегодняшний день редко используется в клинической практике. Это объясняется, во-первых, отсутствием универсальности применяемых в настоящий момент молекулярных маркеров неопластического роста (мутации в генах KRAS и TP53, нестабильность микросателлита BAT26, метилирование промоторных участков ряда генов, потери гетерозиготности и т. д.) для всех КРР [1] и, во-вторых, достаточной трудоемкостью или необходимостью использования дорогостоящего оборудования.

Показано [5], что фрагменты ДНК, выделенные из стула больных с КРР, имели большую молекулярную массу, нежели полученные из стула здоровых. В фекалиях человека обнаруживается небольшое количество клеток кишечного эпителия как следствие физиологического слущивания. Клетки кишечного эпителия быстро обновляются. В норме отшелушенные эпителиальные клетки при прохождении через кишечный тракт полностью или частично разрушаются под действием ферментов, а ДНК этих клеток деградирует. Колоректальные раковые клетки наряду с нормальными попадают в стул человека [6], однако при этом 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.

Следовательно, выявление протяженных фрагментов ДНК, выделенной из образцов стула, может служить универсальным прогностическим маркером для скрининга КРР.

Целью данного исследования стала разработка про-

цедуры диагностики КРР на основе анализа целостности фекальной ДНК

Материал и методы. Подготовка образцов кала. Образцы стула были получены от пациентов хирургического отделения ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова ($n = 91$). В исследовании в том числе участвовали 24 здоровых добровольца, не имеющих новообразований желудочно-кишечного тракта, 7 больных с доброкачественными опухолями и 60 с колоректальным раком. Наличие или отсутствие опухоли установлено методом колоноскопии. Около 1 мл стула было отобрано у каждого индивидуума. Сразу после дефекации пробы помещали в герметичные пластиковые контейнеры, содержащие 1 мл 0,5 М ЭДТА, и хранили при 4°C. Выделение геномной ДНК производили в промежутки от 6 до 24 ч после отбора пробы.

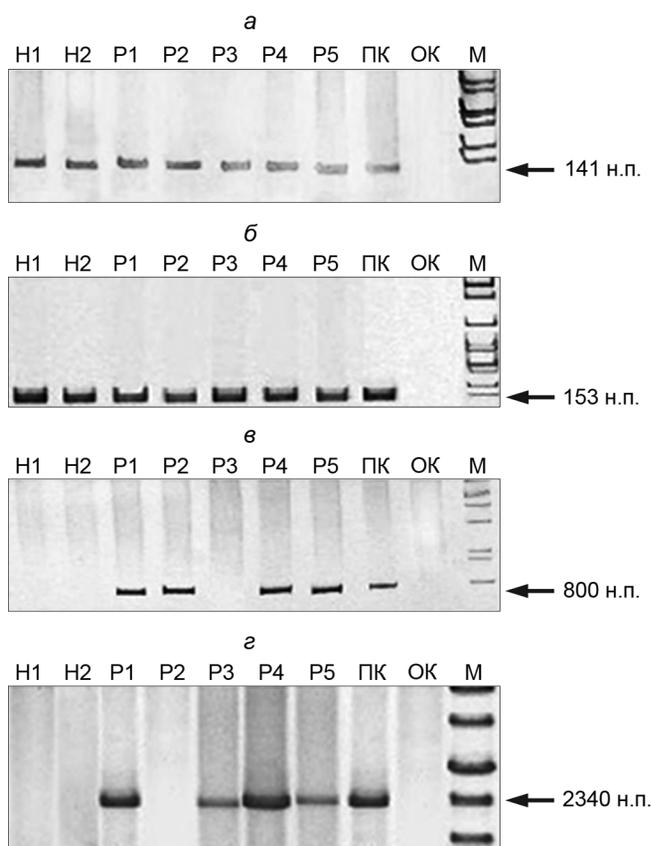
Выделение ДНК. Выделение проводили с использованием набора «ДНК-сорб-В» фирмы «АмплиСенс» ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

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 BLM длиной 153 н. п. ПЦР проводили в стандартных условиях с использованием нуклеозидтрифосфатов фирмы «Медиген» (Новосибирск), праймеров производства НПО «Синтол» (Москва) и Taq-полимеразы фирмы НПО «СибЭнзим» (Новосибирск).

Для оценки целостности геномной ДНК методом ПЦР-анализа использовали два протяженных фрагмента: фрагмент гена TP53 длиной 800 н. п. и фрагмент гена MLH1 длиной 2340 н. п. Полимеразную цепную реакцию проводили при помощи набора Encyclo Plus PCR kit (ЗАО «Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями производителя.

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

Статистический анализ. Для анализа данных использовали программу Graphpad Instat. Различия между



Примеры электрофоретического анализа продуктов амплификации фрагментов ДНК, выделенной из стула.

H1, H2 – продукты амплификации ДНК, выделенной из стула здоровых индивидуумов; P1, P2, P3, P4, P5 – продукты амплификации ДНК, выделенной из стула пациентов с колоректальным раком; ПК – положительный контроль амплификации; ОК – отрицательный контроль амплификации; М – маркер молекулярного веса (ДНК фага λ , расщепленная эндонуклеазой рестрикции PstI); а – фрагмент ДНК длиной 141 н. п. расположен в кодирующей области гена TP53; б – фрагмент ДНК длиной 153 н. п., расположен в кодирующей области гена BLM; в – фрагмент гена TP53 длиной 800 н. п., содержащий 7, 8 и 9-й экзоны; г – фрагмент гена MLH1 длиной 2340 н. п., содержащий 14 и 15-й экзоны.

группами считали достоверными на уровне 95% вероятности при $p < 0,05$.

Результаты. Амплификация коротких фрагментов (< 200 н. п.) успешно проходила как в случае использования образцов ДНК, выделенной из стула больных КРР, так и здоровых. Примеры полученных электрофореграмм представлены на рисунке, а, б.

На следующем этапе методом ПЦР-анализа выявляли протяженные фрагменты ДНК, по присутствию которых судили о наличии у пациента КРР. Данные фрагменты ДНК были обнаружены в стуле 47 из 60 пациентов с КРР, в том числе фрагменты гена TP53 – в 38 случаях, гена MLH1 в 36 случаях, а оба фрагмента выявлены в стуле 27 пациентов. В контрольной группе протяженные фрагменты ДНК в стуле отсутствовали (рисунок, в, г).

Среди 7 доброкачественных новообразований разного гистологического строения (в числе которых 2 тубулярные и 1 ворсинчатая аденома, аденома папиллярно-тубулярного строения, тубулярно-ворсинчатая аденома и 2 гиперпластических полипа) протяженные фрагменты ДНК выявлены у 5 пациентов. Ввиду малой выборки выводы по чувствительности и специфичности делать не представляется возможным.

Результаты статистической обработки полученных данных с помощью программы Graphpad Instat приведены в таблице. Для некоторых групп пациентов подсчитаны следующие параметры: p – вероятность случайности (определена с использованием точного метода Фишера), чувствительность, специфичность, позитивные и негативные предсказательные значения.

Чувствительность и специфичность метода с использованием комбинации из двух генов составили соответственно 78 и 100% ($p < 0,0001$); общая чувствительность была выше по сравнению с каждым отдельным геном.

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.

В анализируемой группе было 36 пациенток, положительный результат выявлен в 29 случаях (чувствительность 82%, $p < 0,0001$), и 24 пациента, положительный

Вероятность случайности, чувствительность, специфичность и предсказательные значения для различных групп пациентов

Параметр	Пациенты	Стадии заболевания		Пол		Фрагменты генов	
		I–II	III–IV	Ж	М	TP53	MLH1
Чувствительность**	0,7833	0,8182	0,7632	0,8056	0,7500	0,6333	0,600
95% CI	0,6578–0,8793	0,5974–0,9481	0,5980–0,8857	0,6396–0,9180	0,5329–0,9023	0,4988–0,7542	0,4657–0,7246
Специфичность***	1	1	1	1	1	1	1
95% CI	0,8575–1	0,8575–1	0,8575–1	0,8575–1	0,8575–1	0,8575–1	0,8575–1
Позитивное предсказательное значение****	1	1	1	1	1	1	1
95% CI	0,9245–1	0,8146–1	0,8806–1	0,8806–1	0,8146–1	0,9075–1	0,9026–1
Негативное предсказательное значение*****	0,6486	0,8571	0,7273	0,7742	0,8	0,5217	0,5
95% CI	0,4750–0,7977	0,6730–0,9597	0,5450–0,8670	0,5894–0,9040	0,6143–0,9229	0,3699–0,6708	0,3527–0,6473

Примечания. * – определена с использованием точного метода Фишера; ** – доля истинных положительных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом; *** – доля истинных отрицательных случаев, которые были правильно идентифицированы тестом; **** – доля пациентов с положительными результатами теста, которые были правильно диагностированы; ***** – доля пациентов с отрицательными результатами теста, которые были правильно диагностированы; $p < 0,0001$.

результат выявлен в 18 случаях (чувствительность 76%, $p < 0,0001$). Для данных групп также нет статистически достоверной разницы в чувствительности метода.

Процедура диагностики КРР, основанная на анализе целостности фекальной ДНК, привлекла внимание исследователей быстротой, дешевизной и возможностью проводить неинвазивную диагностику КРР.

В работе [7] для анализа протяженных фрагментов ДНК использовали фрагмент гена TP53 (1476 н. п.), при этом чувствительность и специфичность метода при выявлении КРР составили 56,3 и 100% соответственно. В нашем исследовании для определения целостности геномной ДНК в качестве маркеров используются два протяженных фрагмента (генов TP53 и MLN1), которые обеспечивают более высокую чувствительность теста. Присутствие двух маркеров связано с наличием двух путей развития заболевания, в которые вовлечены две разные группы генов [8]. Характерными представителями этих путей и служат гены TP53 и MLN1, одновременное повреждение которых встречается с небольшой вероятностью [1, 9].

Так, если у пациента поврежден ген TP53, фрагмент этого гена может не амплифицироваться, однако в предложенном нами тесте будет выявляться фрагмент гена MLN1, что уменьшает вероятность ложноотрицательного заключения.

В исследовании [10] для скрининга КРР проводили ПЦР-анализ длинных (800 п. о.) ампликонов генов APC, KRAS, BRAF и TP53. Чувствительность анализа для диагностики КРР с использованием комбинации из четырех генов была выше по сравнению с каждым отдельным геном. Общая чувствительность составила 56%; специфичность – 96% ($p < 0,0001$).

Alu-повторы в сочетании с ПЦР-анализом (Alu-ПЦР) или с количественной денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографией (QdHPLC) также используются для обнаружения протяженных фрагментов фекальной ДНК для скрининга КРР [8, 11]. Чувствительность Alu-ПЦР была значительно ниже (44%), а его специфичность аналогична (100%) результатам данного исследования (чувствительность 78; специфичность 100%; $p < 0,0001$).

Применение QdHPLC для обнаружения протяженных ПЦР-ампликонов тех же четырех генов, использованных в работе [10] (APC, KRAS, TP53 и BRAF), позволило достичь в пределах погрешности такую же чувствительность (78,6%) и специфичность (91,6%) для скрининга КРР, как и в нашем исследовании (чувствительность 78, специфичность 100%). Существенный недостаток QdHPLC ПЦР – необходимость использования дорогостоящего оборудования, приводящая к большим финансовым затратам. В противоположность этому метод, описанный в данном исследовании, требует только амплификатор и электрофоретическое оборудование, что позволяет обнаруживать протяженные фрагменты ДНК с минимальными затратами.

Заключение. Разработан метод неинвазивной ПЦР-

диагностики КРР на основе анализа целостности ДНК из стула пациента. Чувствительность и специфичность этого способа составили 78 и 100% соответственно. Продемонстрирована возможность использования метода для ранней диагностики КРР. Кроме того, он универсален для диагностики КРР независимо от молекулярно-генетического пути его возникновения и развития.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников ФГБУ «ПНЦФ» им. Б.П.Константинова Романову Ю.А. за помощь в получении биологического материала и Куля Ю.В. за ценные методические советы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–11 см. REFERENCES)

1. Имянитов Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. *Практическая онкология*. 2005; 22: 65–70.

REFERENCES

1. Imyanitov E.N. Clinical and molecular aspects of colorectal cancer: etiopathogenesis, prevention, individualization of treatment. *Prakticheskaya onkologiya*. 2005; 22: 65–70. (in Russian)
2. Davies R.J., Miller R., Coleman N. Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer*. 2005; 5 (3): 199–209.
3. Lieberman D.A., Weiss D.G., Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N. Engl. J. Med*. 2001; 345 (8): 555–60.
4. Young G.P., Bosch L.J. Fecal Tests: From Blood to Molecular Markers. *Curr. Colorectal Cancer Rep*. 2011; 7 (1): 62–70.
5. Boynton K.A., Summerhayes I.C., Ahlquist D.A., Shuber A.P. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clin. Chem*. 2003; 49 (7): 1058–65.
6. Klaassen C.H., Jeunink M.A., Prinsen C.F., Ruers T.J., Tan A.C., Strobbe L.J. et al. Quantification of human DNA in feces as a diagnostic test for the presence of colorectal cancer. *Clin. Chem*. 2003; 49 (7): 1185–7.
7. Yehya A.H., Yusoff N.M., Khalid I.A., Mahsin H., Razali R.A., Azlina F. et al. Pilot study of the sensitivity and specificity of the DNA integrity assay for stool-based detection of colorectal cancer in Malaysian patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2012; 13 (5): 1869–72.
8. Zou H., Harrington J.J., Klatt K.K., Ahlquist D.A. A sensitive method to quantify human long DNA in stool: relevance to colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2006; 15 (6): 1115–9.
9. Fearon E.R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech*. 2011; (6): 479–507.
10. Zhang Y., Suehiro Y., Shindo Y., Sakai K., Hazama S., Higaki S. et al. Long-fragment DNA as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Onc. Letters*. 2015; 9 (1): 454–8.
11. Kalimutho M., Del Vecchio Blanco G., Cretella M., Mannisi E., Sileri P., Formosa A. et al. A simplified, non-invasive fecal-based DNA integrity assay and iFOBT for colorectal cancer detection. *Int. J. Colorectal Dis*. 2011; 26 (5): 583–92.

Поступила 16.02.17

Принята к печати 27.02.17