

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© А. В. Лихтенштейн, Г. И. Потапова, 2001
УДК 616.348/.351-006.6-078.33

А. В. Лихтенштейн, Г. И. Потапова

ДНК-ДИАГНОСТИКА РАКА

НИИ канцерогенеза

Термин «ДНК-диагностика» активно входит в медицинскую практику. Суть этой рождающейся на наших глазах технологии — детекция в биологических жидкостях организма последовательностей ДНК, отличающихся от «канонических», т. е. составляющих геном нормальной клетки данного организма. Их обнаружение является в большинстве случаев свидетельством той или иной патологии и, следовательно, может служить целям диагностики и мониторинга патологического процесса. В практической медицине существует несколько областей возможного применения данного подхода. В одних он уже реализован, в других находится на стадии экспериментальных исследований.

1. *Инфекционные заболевания.* Диагностика инфекций, вызываемых микоплазмами, бактериями и вирусами, с применением чрезвычайно чувствительного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) — рутинная современная практика, существенно более эффективная, чем традиционные подходы [1].

2. *Пrenatal диагностика.* Возможность пренатальной диагностики генетических нарушений плода на основе анализа методом ПЦР материнской крови является предметом интенсивных исследований. В основе данного подхода лежит факт проницаемости плаценты по отношению к клеткам и ДНК плода [31, 33, 41]. Развитие этого подхода позволило бы избежать в определенных ситуациях потенциально опасной процедуры амниоцентеза.

3. *Трансплантация органов.* «Чужеродные» последовательности ДНК присутствуют в организме и как результат трансплантации органов. Эпизоды отторжения пересаженной ткани и сопряженная с ними массовая гибель клеток приводят к появлению в крови и моче реципиента «неканонических» последовательностей [53]. Это обстоятельство может быть использовано для своевременного выявления и предотвращения подобных ситуаций.

4. *Канцерогенез.* Повреждения генов и/или их модификации (имеется в виду метилирование ДНК) — причина трансформации клетки и последующей опухолевой прогрессии [20, 26]. Выявление повреждений (мутации, делеции) онкогенов,

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS

A.V.Lichtenstein, G.I.Potapova

DNA-DIAGNOSIS OF CANCER

Institute of Carcinogenesis

«DNA-diagnosis» is becoming a common methodology in the medical practice. This method involves detection in biological fluids of DNA sequences different from canonical ones, i.e. those composing normal cell genome. Their presence is evidence of a disease in majority of cases and therefore may be used for diagnosis and monitoring of diseases. There are several areas of practical medicine for application of this approach. In some of them this diagnostic methodology is widely applied while in others it is at the stage of experimental trial.

1. *Infectious diseases.* Diagnosis of infections caused by mycoplasmas, bacteria or viruses using an extremely sensitive test, such as polymerase chain reaction (PCR), is a routine practice which is much more effective than conventional techniques [1].

2. *Prenatal diagnosis.* Potentials of PCR testing of mother's blood is under intensive study as to prenatal diagnosis of genetic abnormalities of the fetus. This approach is based upon the fact of placental permeability for cells and DNA of the fetus [31, 33, 41]. Application of this technique would allow the doctors to avoid the potentially dangerous amniocentesis in certain situations.

3. *Organ transplantation.* Foreign DNA sequences may be a result of organ transplantation. Rejection of transplanted tissue and the associated massive cell death lead to appearance of non-canonical sequences in recipient's blood and urine [53]. This finding may be used to detect and prevent such situations.

4. *Carcinogenesis.* Gene damage and/or modification (i.e. DNA methylation) is a cause of cell transformation and further tumor progression [20, 26]. Detection of abnormalities (mutations, deletions) of oncogenes, suppressor and other genes for the purpose of screening, early diagnosis and monitoring of cancer is a new, actively explored area of research [4, 5, 13, 35].

This paper considers theoretical background, problems, methods and perspectives of DNA-diagnosis in oncology.

Difference between genetic and protein markers of tumor growth.

DNA aberration resulting in impairment of cell proliferation regulatory gene functioning (protooncogenes, suppressor genes) is a pathogenic mechanism of neoplastic transformation. In terms

генов-супрессоров и других с целью скрининга, ранней диагностики и мониторинга рака — новая и активно разрабатываемая область [4, 5, 13, 35].

Теоретическим предпосылкам, проблемам, методам и перспективам этого последнего направления посвящена данная работа.

Различия генетических и белковых маркеров опухолевого роста

Повреждения ДНК, нарушающие функцию генов-регуляторов клеточного размножения (протоонкогенов, генов-супрессоров), — патогенетический механизм опухолевой трансформации. В контексте обсуждаемой проблемы (диагностика рака) они выступают как маркеры опухолевого роста (точнее, маркеры канцерогенеза, поскольку «критическая масса» генетических повреждений накапливается в доклинической, латентной стадии, длящейся иногда десятилетия). Их отличия от известных маркеров, давно и эффективно используемых в клинической практике [6], перечислены в табл. 1.

Необходимо заметить, однако, что в настоящее время о некоторых из различий можно судить лишь в принципиальном плане, поскольку потенциально высокие возможности ДНК-диагностики рака находятся пока еще на стадии экспериментального тестирования.

Принципиальное, определяющее все последующие различия традиционных и «новых» маркеров опухолевого роста — объект исследования: белки в первом случае и ДНК — во втором. Белковые маркеры опухолевого роста известны на протяжении почти 40 лет (начиная с открытия α -фетопротеина [3]); их число постоянно растет, а применение в клинической практике как диагностического средства стало рутинным. Синтез большинства белковых маркеров тканеспецифичен (повышение содержания в сыворотке крови, например α -фетопротеина, может служить указанием на рак печени, а раково-эмбрионального антигена — на рак толстой кишки). В то же время специфичность белковых маркеров в отношении собственно опухолевого процесса весьма относительна: они продуцируются соответствующими клетками и в иных ситуациях — на эмбриональной стадии развития и при других патологических состояниях. Белки, экскретируемые опухолевыми клетками в окружающую среду, достигают в ней ощутимой (определяемой современными методами) концентрации обычно в тот момент, когда уже имеет место сформировавшаяся опухоль.

Возможность рассматривать специфические повреждения ДНК (мутации онкогенов и генов-супрессоров, изменения микросателлитных последовательностей) как маркеры канцерогенеза была впервые продемонстрирована всего несколько лет назад [14, 40]. По ряду свойств белковые и генетические маркеры существенно различаются. Так, очевидно, что онкоспецифичность последних в отличие от первых абсолютна, поскольку специфические повреждения ДНК — это и первопричина, и движущая сила опухолевого процесса. Напротив, тканеспецифичностью (за некоторыми исключениями, см. ниже) ДНК-маркеры не обладают. Имеется в виду то обстоятельство, что выявление тех или иных мутаций не позволяет, как правило, судить о локализации процесса. Это происходит из-за того, что механизмы клеточного деления, нарушение которых собственно и является причиной возникновения опухоли, во-первых, принципиально одни и те же во всех типах клеток и, во-вторых, чрезвычайно сложны, что способствует реализации конечного результата (трансформации) множеством разных способов.

Таблица 1

Table 1

Сопоставление известных «белковых» и генетических маркеров опухолевого роста

Comparison of protein and genetic markers of tumor growth

Характеристики маркеров	Известные маркеры	ДНК-маркеры
Объект исследования Object of study	Белки / Proteins	ДНК / DNA
Онкоспецифичность Oncospecificity	Относительная Relative	Абсолютная Absolute
Тканевая специфичность Tissue specificity	Высокая / High	Практически отсутствует Practically none
Стадия выявления Stage at detection	Сформированная опухоль Tumor mass	Инициированные клетки Initiated cells
Предмет анализа Object of analysis	Продукты жизнедеятельности клетки Cell life products	Продукты гибели клетки Cell death products
The characteristics of markers	Conventional markers	DNA markers

of our problem (cancer diagnosis) they play another role, i.e. are considered as tumor growth markers (more accurately, carcinogenesis markers because critical mass of genetic aberrations is gained at the preclinical, latent stage that in some cases may last for decades). Table 1 summarizes their differences from other conventional markers widely used in clinical practice [6].

It should be noted however that some of the differences may be but presumptive since the high potentials of DNA diagnosis of cancer are currently under experimental trial.

The basic difference between the conventional and new tumor growth markers that is of much importance for all the remaining distinctions is object of study, i.e. proteins versus DNA. Protein tumor growth markers have been known for about four decades (beginning from discovery of α -fetoprotein [3]); their number is continuously rising and their clinical application as a diagnostic test is a routine practice. Most protein markers are characterized by tissue-specific synthesis (e.g. increased serum α -fetoprotein content may be evidence of liver cancer, elevated carcinoembryonic antigen concentration is indicative of colonic cancer). However, specificity of protein markers in relation to neoplastic process is not so clear: they may be produced by certain cells in other situations too (e.g. at embryonic stage of development and in other pathological conditions). Proteins excreted into environment by tumor cells reach a detectable concentration when a considerable mass already exists.

The possibility to consider specific DNA aberrations (oncogene and suppressor gene mutations, abnormalities in microsatellite sequences) as markers of cancer development was first proposed several years ago [14,40]. The protein and genetic markers have several distinctions. For instance, oncospecificity of genetic markers is absolute because specific DNA aberrations are both a cause and a driving force of neoplastic disease. In contrast, DNA-markers (except for few ones) do not demonstrate tissue-specificity, i.e.

Латентный период канцерогенеза (от первых нарушений генома клетки до клинических проявлений) может занимать несколько десятилетий. Это обстоятельство позволяет надеяться на использование ДНК-маркеров как средства не только ранней диагностики уже существующего опухолевого очага, но и скрининга иницированных клеток на доклинической стадии процесса.

Кардинальное различие белковых и генетических маркеров заключается также в том, что если первые являются продуктом клеточной жизнедеятельности, то вторые — клеточной гибели (апоптоза) [8]. ДНК может оказаться в окружающей среде только в результате разрушения клетки. Большая ее доля при этом захватывается окружающими клетками и реутилизируется, а меньшая попадает в кровеносное русло, где некоторое время циркулирует, частично же экскретируется с мочой [7, 9]. Постоянно идущий процесс обновления всех тканей организма обеспечивается динамическим равновесием пролиферации и апоптоза. Именно осознание в последние годы фундаментальной роли апоптоза как процесса, уравнивающего пролиферацию, явилось стимулом к направленным поискам в биологических жидкостях организма генетических элементов разного клеточного происхождения (трансплантат, эмбрион, опухоль; см. выше). Можно было полагать, что циркулирующие в кровеносном русле молекулы ДНК достаточно в этом смысле «репрезентативны».

Локальная и общая ДНК-диагностика рака

Соответственно широте топического диапазона ДНК-диагностики рака можно подразделить на локальную и общую. В первом случае речь идет о выявлении специфических повреждений ДНК в различных выделениях человеческого организма. Так, показана диагностическая значимость выявления опухолевых ДНК-маркеров в моче (при раке мочевого пузыря и почек) [15, 16, 18, 21, 24, 37, 43, 45, 47], фекальных массах (при раке толстой кишки и пищеварительного тракта) [38, 46], соке поджелудочной железы (при раке соответствующей локализации) [48, 52], слюне (при опухолях головы и шеи) [12], мокроте (при раке легких) [34, 36, 42, 50].

Наряду с локальной ДНК-диагностикой рака, имеющей относительно ограниченное применение, в последние годы активно развивается иное, более общее направление, основанное на доказанной в настоящее время возможности выявлять в крови человека фрагменты ДНК гибнущих клеток разного происхождения (см. выше) и имеющее конечной целью раннюю диагностику и скрининг возможно более широкого круга онкологических заболеваний [2]. Так, оказалось возможным обнаружить в сыворотке и плазме крови больных злокачественными новообразованиями разной локализации (опухоли головы и шеи, легких, толстой кишки, поджелудочной железы, печени) повреждения ДНК, тождественные таковым самой опухоли [10, 13, 14, 17, 19, 22, 23, 27–29, 32, 38–40, 44, 48, 49, 51]. Специфические повреждения ДНК были выявлены не только в крови, но и в моче больных опухолями толстой кишки и поджелудочной железы [7, 11].

Объекты исследования и разновидности ДНК-маркеров

Объектом диагностического анализа в данном контексте являются ДНК митохондрий (мит-ДНК) и клеточного ядра. Если в последнем случае такой подход вполне очевиден (все имеющие отношение к канцерогенезу гены ядерного происхождения), то введение мит-ДНК в круг объектов ДНК-диагностики рака — одно из достижений последнего времени [23].

detection of certain mutations is as a rule not indicative of disease site. This happens because mechanisms of cell proliferation whose impairment leads to tumor development are, first, similar in all cell types, and, second, very complicated, and therefore the transformation may proceed in many ways.

Cancer latency (from the first abnormalities in cell genome to clinical evidence) may last for several decades. Therefore DNA-markers may be used for both early diagnosis of existing tumors and screening of initiated cells at preclinical stage.

Another principal difference between the protein and genetic markers is that the first are products of cell life while the latter are a result of cell death (apoptosis) [8]. DNA may be released into environment only as a result of cell destruction. The cell major portion is captured by surrounding cells and re-utilized, while the remaining minor portion penetrates into circulation and is partially excreted in urine [7,9]. The continuous renovation of all tissues in the body is ensured by the dynamic balance between proliferation and apoptosis. The recent recognition of apoptosis as a proliferation-balancing process enhanced the purposeful search for genetic elements of different cellular origin in the body fluids (transplant, embryo, tumor, see above). It seemed that the circulating DNA molecules were rather representative.

Local and general DNA diagnosis of cancer.

In accordance with topic range of DNA diagnosis of cancer the methodology may be subclassified as local and general. Local DNA diagnosis is based on finding DNA specific aberrations in various excretions of the human body. For instance, urinary tumor DNA markers have diagnostic value in cancer of the bladder and kidneys [15,16,18,21,24,37,43,45,47], fecal DNA markers are indicative of colonic and digestive tract tumors [38,46], the markers found in pancreatic juice predict pancreatic cancer [48,52], salivary markers suggest that head and neck tumors are present [12], DNA aberrations in sputum are predictive of lung cancer [34,36,42,50].

Over the last years besides the local DNA diagnosis of cancer, there was a marked progress in development of a more general methodology that involves detection of DNA fragments from cells of different origin (see above) and is aimed at early diagnosis and screening of a broader range of cancer types [2]. For instance, DNA aberrations characteristic of respective tumors were found in blood serum and plasma of patients with cancer of different sites (head and neck, lung, colon, pancreas, liver) [10,13,14,17,19,22,23,27–29,32,38–40,44,48,49,51]. Cases with colonic and pancreatic cancers presented with specific DNA aberrations both in blood and urine [7,11].

Objects of study and types of DNA markers.

Objects of the diagnostic study are DNA of mitochondria (mit-DNA) and cell nucleus. The choice of the latter object is well understandable (all cancerogenic genes are of nuclear origin), while DNA diagnosis on the basis of mit-DNA is a recent development [23].

Notwithstanding the well-known evidence of certain functional impairment of tumor cell mitochondria, their contribution to cell differentiation, and their important effector role at late apoptosis stage [25], there is still no clear understanding of relationship between mit-DNA mutations and carcinogenesis. Then it is very interesting that mit-DNA which are small ring molecules (16.5 base pairs) mutate at a high rate in tumors of a variety of sites (bladder, head and neck, lungs). Since every cell contains

Хотя давно известны факты, свидетельствующие, во-первых, о некоторой функциональной «ущербности» митохондрий опухолевых клеток, во-вторых, о их роли как клеточного компонента, способствующего клеточной дифференцировке, и, в-третьих, о их важной эффекторной роли на поздних стадиях апоптоза [25], нет пока ясного понимания того, какое отношение мутации мит-ДНК могут иметь к процессу канцерогенеза. Тем интереснее то обстоятельство, что в опухолях разной локализации (мочевой пузырь, голова и шея, легкие) мит-ДНК, представляющие собой кольцевые молекулы размером всего 16,5 тыс. пар оснований, мутируют с высокой частотой. Поскольку в каждой клетке содержатся тысячи митохондрий (с 1—10 копиями ДНК в каждой), то общее число молекул мит-ДНК весьма велико. С этой точки зрения парадоксом выглядит то обстоятельство, что исходно идентичные (поскольку происходят от материнской яйцеклетки) и независимо реплицирующиеся митохондриальные ДНК в массе своей несут в опухолевых клетках одни и те же мутации [23]. Данное наблюдение может свидетельствовать о том, что приобретенные мутации дают молекулам некие селективные преимущества. С практической же точки зрения отмеченные особенности придают мит-ДНК особую диагностическую ценность, поскольку их многокопийность существенно упрощает выявление мутаций. Так, в сыворотке крови онкологических больных относительная концентрация мутантных мит-ДНК на 1—2 порядка величин превышала таковую мутантного ядерного гена-супрессора p53 (относится к числу уникальных генов).

Главным объектом генодиагностики является тем не менее ядерная ДНК. Именно здесь сосредоточены те многочисленные генетические элементы, повреждение которых приводит к злокачественной трансформации клетки. Следует подчеркнуть, что в данном контексте эти специфические, имеющие отношение к канцерогенезу «поломки» ДНК рассматриваются в ином, чем обычно, качестве — не как факторы патогенеза, а

several thousand mitochondria (with 1 to 10 DNA copies each), the total of mit-DNA molecules is very high. It is then paradoxical that the initially identical (because originate from the mother ovum) and independently replicating mitochondrial DNA carry the same mutations in tumor cells [23]. This feature suggests that the acquired mutations give certain selective advantages to the molecules. In terms of diagnostic value, these mutations are of much significance because their multi-copy character facilitates mutation detection. For example, relative blood concentration of mutant mit-DNA in cancer patients is 1 to 2 orders of magnitude greater than that of mutant suppressor gene p53 (which is a unique gene).

However, nuclear DNA is the principal object of study in gene diagnosis. It is the principal place in which multiple gene elements are found whose mutations result in cell malignant transformation. Note that in this context these specific cancer-related DNA fragments are considered as tumor growth markers rather than pathogenesis factors. Their value as the markers is determined by frequency of matching with various tumor types, and by reliability (sensitivity) of detection, irrespective of functional consequences of DNA aberrations and genetic elements they affect.

Table 2 summarizes standard DNA aberrations mainly used as cancer markers, such as (a) mutations (cluster mutations affecting only 1 to 3 codones like in RAS oncogenes, or scattered mutations that can occur along the whole gene like in suppressor gene P53), (b) length alteration of microsatellite repeats suggestive of genome instability, (c) loss of an allele in a microsatellite locus of many ones scattered in genome (suggestive of a possible deletion of an adjacent suppressor gene), (d) promoter aberrant methylation resulting in inactivation of the adjacent suppressor gene (this event is an epigenetic equivalent of mutation).

These typical aberrations may affect a variety of oncogenes and suppressor genes, and therefore the defect mosaics specific of particular tumor types may vary greatly. This is an answer to the

Т а б л и ц а 2

Генетические дефекты как опухолевые маркеры / Genetic defects as tumor markers

Table 2

ДНК	Участок дефекта	Тип дефекта	Последствия	Прототип
Мит-ДНК Mit-DNA	Регуляторный Regulatory	Мутации / Mutations	?	D-петля / D-loop
	Гены / Genes	—	?	ND4
Я-ДНК* N-DNA*	Гены / Genes	Мутации (кластерные) Mutations (cluster type)	Активация онкогена Oncogene activation	RAS
		Мутации (рассеянные) Mutations (scattered type)	Инактивация супрессора Suppressor inactivation	P53
	Промоторы Promoters	Метилирование Methylation	Инактивация супрессора Suppressor inactivation	P16
	Микросателлиты Microsatellites	Изменения длины, LOH** Length alteration LOH**	RER*** / RER*** Делеция супрессора Suppressor deletion	D2S123 D2S123
DNA	Defect site	Defect type	Result	Prototype

* Я-ДНК — ядерная ДНК.

** LOH — потеря гетерозиготности.

*** RER — следствие ошибок репликации.

* N-DNA, nuclear DNA.

** LOH, loss of heterozygosity.

*** RER, replication errors.

как маркеры опухолевого роста. Безотносительно к тому, каковы функциональные последствия тех или иных повреждений ДНК и какие конкретно генетические элементы они затрагивают, их значимость как маркеров определяется частотой совпадения с различными видами опухолей, во-первых, и надежностью (чувствительностью) детекции — во-вторых.

В табл. 2 показаны стандартные, чаще всего используемые в качестве маркеров типы повреждений ДНК: а) мутации (классические, затрагивающие всего 1—3 кодона, как в случае онкогенов RAS, или рассеянные, могущие возникать по всей длине гена, как в случае гена-супрессора P53); б) изменения длины микросателлитных повторов, свидетельствующие о нестабильности генома; в) потеря одного аллеля какого-либо микросателлитного локуса, одного из множества рассыпанных по геному (указание на возможную делецию прилежащего гена-супрессора); д) aberrантное метилирование промотора, имеющее следствием инактивацию прилежащего гена-супрессора (это событие является эпигенетическим эквивалентом мутации).

Такие типичные повреждения могут затрагивать разные онкогены и гены-супрессоры, в силу чего «мозаика» дефектов, присутствующих разным опухолям, может быть совершенно различной. Это обстоятельство объясняет, почему выявление в биологических средах организма специфических мутаций не дает возможности судить о локализации самой опухоли. С другой стороны, хотя сегодня известны десятки протоонкогенов и генов-супрессоров, повреждения которых могут вносить определенный вклад в развитие опухолевого процесса, наиболее часто встречаются и, следовательно, наиболее показательны в диагностическом отношении всего несколько, частично перечисленные в табл. 2: онкогены RAS, MYC, JUN, BCL-2, MDM2; гены-супрессоры P53, RB1, P16, P15, BRCA1, E-cad, VHL; ген репарации ДНК MLH2 и др. В совокупности повреждения этих генов (хотя бы одного или нескольких из них) наблюдаются в подавляющем числе опухолей человека. Таким образом, существует принципиальная (пока еще не реализованная) возможность, используя относительно небольшую панель тестов к ограниченному числу генетических элементов, с одной стороны, и анализируя ДНК биологических жидкостей (крови и мочи) — с другой, судить в целом об «онкологическом статусе» организма.

Методы детекции генетических повреждений

Практически обязательным этапом любого ДНК-диагностического теста является ПЦР. Только благодаря этому методу исследователь располагает сегодня любым интересующим его фрагментом генома данного индивидуума в количествах, достаточных для последующих манипуляций: прямого секвенирования, рестриктивного анализа, гель-электрофоретического разделения и др. В зависимости от целей разработаны десятки модификаций ПЦР: «обогащенный» ПЦР; ПЦР, специфический по отношению к метилированным последовательностям (methylation-specific PCR); ПЦР, избирательно амплифицирующий CpG-островки (функционально значимые регуляторные последовательности) и т. д. Исключительная эффективность этих методов позволяет выявить в ДНК биологических жидкостей онкологических больных дефекты, присущие самой опухоли, и на этом основании разрабатывать диагностические подходы.

Проблемы и перспективы

Трудности, с которыми сталкивается ДНК-диагностика рака, вполне очевидны: а) низкое содержание ДНК в биологических

жидкостях человека и связанная с этим необходимость ее выделения из разведенных растворов; б) присутствие в этих жидкостях наряду с «опухолевой», т. е. мутантной, ДНК громадного избытка последовательностей дикого типа (т. е. ДНК, происходящей из гибнущих нормальных клеток; их ежедневно погибает в организме около 1011), что сильно затрудняет выявление первой; в) внеклеточный распад ДНК

Methods to detect genetic aberrations.

PCR is a mandatory component of any DNA test. It is owing to this method the investigator may have any genome fragment of interest in a sufficient amount for further direct sequencing, restriction analysis, gel electrophoresis, etc. There are dozens of target-specific PCR modifications, such as enriched PCR, methylation-specific PCR, CpG-islet selective amplification PCR, etc. The exclusive effectiveness of these tests allows the investigator to detect tumor-specific defects in DNA of biological fluids from cancer cases and to develop diagnostic approaches on the basis of the findings.

Problems and prospects. Problems the DNA diagnosis faces are well seen: (a) low DNA content in human biological fluids and the respective necessity of its extraction from diluted solution, (b) the presence of wild DNA sequences (DNA from normal dying cells whose number reaches 1011 daily) together with tumor-specific (mutant) DNA, (c) extracellular DNA decay to low-molecular weight fragments under the effect of hydrolytic enzymes.

It is therefore clear, that the prospects of DNA diagnosis of cancer depend fully upon development of methods providing preservation and quantitative extraction of DNA from human biological fluids, analysis of low molecular weight fragments, reliable discrimination of mutant from normal sequences. There is much hope that these problems will be overcome owing to the advance in the existing approaches and development of new, high-sensitivity assays involving radioactive and fluorescent tagging. Good prospects may be expected for novel approaches such as rolling ring isothermal amplification that is much more specific and effective than PCR [30].

It is possible that in future the DNA diagnosis will be able to find tumor sites. These hopes are related to DNA methylation whose impairment is to a certain degree tissue-specific. So, there are reasons to hope that DNA markers of carcinogenesis will be used both as a means for early diagnosis and monitoring of tumor growth and for assessment of oncological status of the body before any clinical signs are seen.

жидкостях человека и связанная с этим необходимость ее выделения из разведенных растворов; б) присутствие в этих жидкостях наряду с «опухолевой», т. е. мутантной, ДНК громадного избытка последовательностей дикого типа (т. е. ДНК, происходящей из гибнущих нормальных клеток; их ежедневно погибает в организме около 1011), что сильно затрудняет выявление первой; в) внеклеточный распад ДНК

до низкомолекулярных фрагментов под воздействием гидролитических ферментов.

С этой точки зрения очевидно, что перспективы применения ДНК-диагностики рака в клинической практике целиком определяются развитием соответствующих методов, а именно: позволяющих сохранять и количественно выделять ДНК из биологических жидкостей организма, анализировать низкомолекулярные фрагменты, надежно дискриминировать мутантные и нормальные последовательности. Исходя из быстрого совершенствования уже существующих подходов и развития новых, чрезвычайно чувствительных, связанных с применением радиоактивной и флюоресцентной меток, можно надеяться на скорое преодоление существующих проблем. Особые надежды в этом смысле связаны с появлением принципиально новых подходов, таких как изотермическая амплификация по типу «катыщегося кольца», существенно более специфичная и эффективная, чем ПЦР [30].

Не исключена в будущем и возможность посредством ДНК-диагностики судить о локализации опухолевого очага. Эти надежды связаны с феноменом метилирования ДНК, нарушения которого при канцерогенезе имеют до некоторой степени тканеспецифический характер. Таким образом, есть основания надеяться, что в не столь отдаленном будущем ДНК-маркеры канцерогенеза войдут в практику не только как средство ранней диагностики и мониторинга опухолевого роста, но и как средство скрининга, позволяющего оценивать «онкологический статус» организма до каких бы то ни было клинических проявлений.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Генодиагностика в современной медицине // Сборник тезисов докладов 3-й Всероссийской научно-практической конференции. — М., 2000. — С. 192.
2. The Second International Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS-2), Hong Kong, 2001 // Clin. Chem. — 2001. — Vol. 47(2). — P. 361—370.
3. Абелев Г. И., Перова С. Д., Храмова Н. И. и др. // Transplant. — 1963. — Vol. 1. — P. 174—180.
4. Белохвостов А. С. // Вместе против рака. — 2000. — Вып. 2 (1). — С. 20—23.
5. Белохвостов А. С., Новик А. А. // Вопр. онкол. — 1999. — Т. 45 (6). — С. 599—606.
6. Лихтенштейн А. В., Бассалык Л. С. // Элементы патологической физиологии и биохимии / Под ред. И. П. Ашмарина. — М., 1997. — С. 129—153.
7. Моляка Ю. К., Ботезату И. В., Потапова Г. И. и др. // Вестн. РАМН. — 2000. — № 7. — С. 24—27.
8. Уманский С. Р. // Молекул. биол. — 1996. — Т. 30. — С. 487—502.
9. Шелепов В. П., Арсенин С. Л., Ботезату И. В. и др. // Вестн. Рос. онкол. науч. центра РАМН. — 1997. — № 4. — С. 13—17.
10. Anker P., Mulcahy H., Chen X. Q., Stroun M. // Cancer Metastasis Rev. — 1999. — Vol. 18. — P. 65—73.
11. Botezatu I., Serdyuk O., Potapova G. et al. // Clin. Chem. — 2000. — Vol. 46. — P. 1078—1084.
12. Boyle J. O., Mao L., Brennan J. A. // Am. J. Surgery. — 1994. — Vol. 168. — P. 429—432.
13. Burchill S. A., Selby P. J. // J. Pathol. — 2000. — Vol. 190. — P. 6—14.
14. Chen X. Q., Stroun M., Magnenat J.-L. et al. // Nat. Med. — 1996. — Vol. 2. — P. 1033—1035.
15. Christensen M., Wolf H., Orntoft T. F. // Int. J. Cancer. — 2000. — Vol. 85. — P. 614—617.
16. Conejo J. R., Parra T., Cantero M. et al. // Clin. Chem. — 1998. — Vol. 44. — P. 1570—1572.
17. Coulet F., Blons H., Cabelguenne A. et al. // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60. — P. 707—711.
18. Cristaudo A., Vivaldi A., Guglielmi G. et al. // J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. — 1997. — Vol. 16. — P. 201—204.
19. de Kok J. B., van Solinge W. W., Magnenat J.-L. et al. // Scand. J. Lab. Investig. — 1997. — Vol. 57. — P. 601—604.
20. DePinho R. A. // Nature. — 2000. — Vol. 408. — P. 248—254.
21. Eisenberger C. F., Schoenberg M., Enger C. et al. // J. natl. Cancer Inst. — 1999. — Vol. 91. — P. 2028—2032.
22. Esteller M., Sanchez-Céspedes M., Rosell R. et al. // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 67—70.
23. Fliss M. S., Usadel H., Caballero O. L. et al. // Science. — 2000. — Vol. 287. — P. 2017—2019.
24. Friedrich M. G., Erbersdobler A., Schwaibold H. et al. // J. Urol. — 2000. — Vol. 163. — P. 1039—1042.
25. Garesse R., Vallejo C. G. // Gene. — 2001. — Vol. 263. — P. 1—16.
26. Herman J. G. // Seminars in cancer biology. — 1999. — Vol. 9. — P. 359—367.
27. Kirk G. D., Camus-Randon A. M., Mendy M. et al. // J. natl. Cancer Inst. — 2000. — Vol. 92. — P. 148—153.
28. Kopreski M. S., Benko F. A., Kwee C. et al. // Br. J. Cancer. — 1997. — Vol. 76. — P. 1293—1299.
29. Leon S. A., Shapiro B., Sklaroff D. M., Yaros M. J. // Cancer Res. — 1977. — Vol. 37. — P. 646—650.
30. Lizardi P. M., Huang X., Zhu Z. et al. // Nature Genetics. — 1998. — Vol. 19. — P. 225—232.
31. Lo Y. M. D. // Clin. Chem. — 2000. — Vol. 46 (12). — P. 1903—1906.
32. Lo Y. M. D., Chan L. Y. S., Lo K. W. et al. // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — P. 1188—1191.
33. Lo Y. M. D., Lau T. K., Chan L. Y. S. et al. // Clin. Chem. — 2000. — Vol. 46 (9). — P. 1301—1309.
34. Mao L., Ralph H. H., Boyle J. O. et al. // Cancer Res. — 1994. — Vol. 54. — P. 1634—1637.
35. Mao L., Sidransky D. // Ibid. — P. 1939—1940.
36. Mills N. F., Fishman C. L., Scholes J. et al. // J. natl. Cancer Inst. — 1995. — Vol. 87. — P. 1056—1060.
37. Mourah S., Cussenot O., Vimont V. et al. // Int. J. Cancer. — 1998. — Vol. 79. — P. 629—633.
38. Mulcahy H., Farthing M. J. // Ann. Oncol. — 1999. — Vol. 10, Suppl. 4. — P. 114—117.
39. Mulcahy H. E., Lyautey J., Lederrey C. et al. // Clin. Cancer Res. — 1998. — Vol. 4. — P. 271—275.
40. Nawroz H., Koch W., Anker P. et al. // Nat. Med. — 1996. — Vol. 2. — P. 1035—1037.
41. Poon L. L. M., Leung T. N., Lau T. K., Lo Y. M. D. // Clin. Chem. — 2000. — Vol. 46 (11). — P. 1832—1834.
42. Ronai Z., Yakubovskaya M., Zhang E., Belitsky G. A. // J. cell. Biochem. — 1997. — Vol. 25S. — P. 172—176.
43. Saito S., Hata M., Fukuyama R. et al. // Int. J. Urol. — 1997. — Vol. 4. — P. 178—185.
44. Sanchez-Céspedes M., Esteller M., Wu L. et al. // Cancer Res. — 2000. — Vol. 60. — P. 892—895.
45. Schneider A., Borgnat S., Lang H. et al. // Ibid. — P. 4617—4622.
46. Sidransky D., Tokino T., Hamilton S. R. et al. // Science. — 1992. — Vol. 256. — P. 102—105.
47. Steiner G., Schoenberg M. P., Linn J. F. et al. // Nat. Med. — 1997. — Vol. 3. — P. 621—624.
48. Tada M., Omata M., Kawai S. et al. // Cancer Res. — 1993. — Vol. 53. — P. 2472—2474.
49. Wong I. H., Lo Y. M., Zhang J. et al. // Ibid. — 1999. — Vol. 59. — P. 71—73.
50. Yakubovskaya M., Spiegelman V., Luo F. C. et al. // Int. J. Cancer. — 1995. — Vol. 63. — P. 810—814.
51. Yamada T., Nakamori S., Ohzato H. et al. // Clin. Cancer Res. — 1998. — Vol. 4. — P. 1527—1532.
52. Yamaguchi Y., Watanabe H., Yrdiran S. et al. // Clin. Cancer Res. — 1999. — Vol. 5. — P. 1147—1153.
53. Zhang J., Tong K. L., Li P. K. et al. // Clin. Chem. — 1999. — Vol. 45. — P. 1741—1746.

Поступила 19.03.01 / Submitted 19.03.01