

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ФРАГМЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ДНК КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

А.А. БОНДАРЬ¹, С.Н. ТАМКОВИЧ^{1,2}, И.В. МОРОЗОВ¹, А.А. БОНДАРЬ¹,
В.В. ВЛАСОВ¹, П.П. ЛАКТИОНОВ¹

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск¹
Новосибирский государственный университет²*

Актуальность. Поиск маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток, которые можно выявить в крови, является актуальной задачей. Такими маркерами могут быть циркулирующие в крови внеклеточные ДНК. Действительно, было показано, что в циркулирующей крови могут быть обнаружены ДНК клеток опухолей, локализованных в разных органах и тканях, а использование ПЦР обеспечивает высокую чувствительность детекции единичных молекул ДНК, характерных для клеток опухолей. Однако не все ДНК маркеры, эффективно выявляемые в опухолевой ткани, могут быть обнаружены в циркулирующей крови в силу многообразия факторов, обуславливающих появление и циркуляцию в крови ДНК из клеток опухоли. К числу таких факторов можно отнести упаковку ДНК, копияность областей генома (известно, что возникновение опухолей часто сопровождается амплификацией некоторых участков генома), механизмы возникновения (апоптоз и/или секреция), и стабильность по отношению к действию нуклеаз крови. В связи с этим актуальной задачей является исследование последовательностей фрагментов циркулирующих ДНК в крови здоровых доноров и онкологических больных.

Целью нашей работы являлось оценить практическую ценность данных, которые могут быть получены в результате секвенирования внеклеточных нуклеиновых кислот крови онкологических больных и здоровых доноров, для поиска новых онкомаркеров.

Материал и методы. В работе были использованы образцы крови здоровых доноров, больных раком молочной железы и больных раком предстательной железы. Внеклеточную ДНК выделяли с использованием микроколонок

«Биосилика». Препараты внеклеточных ДНК крови обрабатывали эндонуклеазами рестрикции (Bsp143I и EcoRI) и клонировали, в клетках E. Coli штамма XL-Blue с использованием вектора pBlueScript II KS(-). Последовательности вставок внеклеточных ДНК были определены методом автоматического секвенирования (секвенатор ABI PRIZM 3110) и идентифицированы при помощи возможностей, предоставляемых серверами BLAT и BLAST.

Результаты. Как в норме, так и при патологии не обнаружено пропорциональной зависимости между количеством представленных фрагментов внДНК и размером хромосомы источника. При этом среди проанализированных последовательностей фрагментов внДНК крови больных раком предстательной железы наиболее представлены фрагменты 7 хромосомы, а среди фрагментов внДНК крови больных раком молочной железы – фрагменты 1, 6, 8 и 11 хромосомы. Согласно литературным данным исследованные фрагменты вышеперечисленных хромосом, относятся к участкам ДНК, изменения в которых ассоциированы с развитием и течением данных заболеваний. Кроме того, в составе внДНК крови онкологических больных обнаруживаются фрагменты генов, ассоциированных с исследуемыми злокачественными новообразованиями (в крови больных раком молочной железы были обнаружены фрагменты генов GSTA1, ANKRD6, ZNF217, DKFZp566C0424, а в крови больных раком предстательной железы – фрагменты генов ADAM12, CYP1B4 и CDH4).

Выводы. Полученные данные демонстрируют, что секвенирование внеклеточной ДНК крови может быть использовано для поиска новых диагностических ДНК маркеров онкологических заболеваний.