

**НОВЫЕ МЕТОДЫ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ, ОСНОВАННЫЕ  
НА ДОСТИЖЕНИЯХ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ.  
ПРОЕКТ № 141**

**Координатор:** акад. РАН Власов В. В.  
**Исполнители:** ИХБФМ, ИЦиГ, ИТПМ СО РАН

**Разработка новых методов определения концентраций рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот в плазме крови и их использование в медицинской диагностике.** Разработан эффективный метод выделения фрагментированных нуклеиновых кислот из биологических жидкостей, основанный на связывании нуклеиновых кислот со специально приготовленным мелкодисперсным стеклом. Разработан метод, пригодный для одновременного определения концентраций ДНК и РНК в биологических жидкостях, основанный на использовании флуоресцентных красителей Hoechst 33258 и SYBR Green II, позволяющий измерять концентрации РНК и ДНК в диапазоне 10—1000 нг/мл в крови здоровых доноров и больных пациентов. Определены концентрации ДНК и РНК в плазме крови здоровых доноров, которые составляют  $38 \pm 14$  нг/мл и  $220 \pm 50$  нг/мл (в плазме 30 % доноров). Достоверно показано, что уровень внеклеточных нук-

леиновых кислот крови возрастает при травме и может быть использован для оценки тяжести травмы. Показано: в крови больных с раком молочной железы практически отсутствуют нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью клеток крови, в то время как они присутствуют не менее чем у 70 % больных с доброкачественными опухолями (фиброаденома, цистозителиома) молочной железы. Такое распределение обнаружено впервые и может быть использовано для разработки дифференциальной диагностики опухолей молочной железы.

**Разработка методов онкодиагностики, основанная на анализе онкоспецифических циркулирующих нуклеиновых кислот.** Исследовано метилирование промоторных областей генов p16, GSTP1, CDH1, CDH13, RASSF1, RAR $\beta$ , APC, HIG в составе внеклеточных нуклеиновых кислот крови методом полимеразной цепной реакции. Показано, что у 95 % больных раком молочной железы и у 60 % больных

*Частота встречаемости (%) метилированных промоторных областей генов RASSF1A, RAR $\beta$  и Cyclin D2 в циркулирующей ДНК крови*

*Frequency of methylation of RASSF1A, RAR $\beta$  and Cyclin D2 gene promoters in circulating DNA*

Гены Genes	Диагноз/Diagnosis					
	Рак молочной железы Breast cancer (n = 20)		Фиброаденома Fibroadenoma (n = 15)		Здоровые доноры Healthy donors (n = 10)	
	ДНК из плазмы Plasma DNA	Суммарная циркули- рующая ДНК Total DNA	ДНК из плазмы Plasma DNA	Суммарная циркули- рующая ДНК Total DNA	ДНК из плазмы Plasma DNA	Суммарная циркули- рующая ДНК Total DNA
RASSF1A или/ог RAR $\beta$ или/ог Cyclin D2	50	100	13	87	0	0
RASSF1A или/ог RAR $\beta$	30	95	13	60	0	0
RASSF1A или/ог Cyclin D2	40	100	6	80	0	0
RAR $\beta$ или/ог Cyclin D2	40	90	13	60	0	0

фиброаденомой в пуле свободных и связанных с поверхностью форменных элементов крови ДНК встречаются маркеры RASSF1A или RARв. У здоровых доноров эти маркеры не выявляются (см. таблицу). Таким образом, анализ метилирования промоторных областей генов RASSF1A и RARв может быть использован для диагностики и мониторинга противоопухолевой терапии больных с опухолями молочной железы.

**Разработка методов сравнительной геномной гибридизации для анализа хромосомных перестроек.** Для клинического анализа хромосомных перестроек предложены два новых метода оценки клинического значения сверхчисленных маркерных хромосом человека: метод детекции эухроматиновых районов и

метод оценки invdup, основанный на многоцветном бэндинге. Созданы ДНК-пробы для флуоресцентной *in situ* гибридизации и классификаторы цветов, разработанные методы использованы для молекулярно-цитогенетической диагностики пациентов.

**Разработка и изготовление опытного образца флуориметра.** Разработан и изготовлен макет прибора, принцип действия которого основан на использовании стационарного галогенового источника света в диапазоне длин волн 350—900 нм и сменных дифракционных фильтров. Показано, что прибор может быть использован для детекции флуоресценции комплексов нуклеиновых кислот с флуоресцентными красителями Hoechst 33258 (360/460 нм) и SYBR Green II (480/520 нм).

#### Основные публикации

1. Morozkin E. S., Laktionov P. P., Rykova E. Y., Vlassov V. V. Fluorometric quantification of RNA and DNA in solutions containing both nucleic acids// *Anal. Biochem.* 2003. V. 322. P. 48—50.
2. Rykova E. Y., Laktionov P. P., Skvortsova T. E., Starikov A. V., Kuznetsova N. P., Vlassov V. V. Extracellular DNA in breast cancer: cell-surface—bound, tumor-derived extracellular DNA in blood of patients with breast cancer and nonmalignant tumors// *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1022. P. 217—221.
3. Laktionov P. P., Tamkovich S. N., Rykova E. Y., Bryzgunova O. E., Starikov A. V., Kuznetsova N. P., Vlassov V. V. Cell-surface—bound nucleic acids: free and cell-surface—bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients// *Ibid.* P. 221—228.
4. Chelobanov B. P., Laktionov P. P., Kharkova M. V., Rykova E. Y., Vlassov V. V. Isolation of nucleic acid binding proteins: an approach for isolation of cell surface, nucleic acid binding proteins// *Ibid.* P. 239—244.
5. Morozkin E. S., Laktionov P. P., Rykova E. Y., Vlassov V. V. Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eukaryotic cells// *Ibid.* P. 244—250.
6. Tamkovich S. N., Bryzgunova O. E., Rykova E. Y., Permyakova V. I., Vlassov V. V., Laktionov P. P. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors// *Clin. Chem.* 2005. V. 51. P. 1317—1319.
7. Рубцов Н. Б., Карамышева Т. В., Гайнер Т. А., Шкляева О. А. Анализ маркерных хромосом: ДНК пробы для оценки возможного клинического значения маркерной хромосомы// *Медицинская генетика.* 2003. Т. 2. С. 520—527.