

Сведения о ходе проведения исследований по Соглашению от 21 февраля 2018 г. № 14.586.21.0062 по теме «Разработка нового метода диагностики онкологических заболеваний на основе гармонизации данных высокопроизводительного секвенирования и белковых чипов с обратной фазой»

Научный руководитель работ д.б.н., проф. В.Н. Попов

В ходе проведения исследований по проекту на этапе №1 «Обоснование и выбор направления исследований, теоретические исследования, отработка методики отбора и хранения проб; создание библиотеки образцов опухолевых тканей, а также оптимизация методики таргетного секвенирования образцов ДНК из опухолевой и здоровой ткани» выполнены следующие работы:

- Подготовлен промежуточный отчет об исследованиях по ГОСТ 7.32-2001, включающий анализ научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов;

- Подготовлен отчет о патентных исследованиях по ГОСТ 15.011-96;

- Разработаны методические указания по процедурам выделения и очистки ДНК из биологических образцов, процедурам секвенирования, методам биоинформатического анализа полученных последовательностей ДНК, процедурам проведения полимеразной цепной реакции для подтверждения полученных данных;

- Разработана методика получения проб ДНК и подготовки библиотек для секвенирования;

- Произведен отбор пациентов, прошедших курс химиотерапии, таргетной терапии, лучевой терапии либо их комбинаций, ожидающих операции, и имеющих положительный прогноз;

- Получен послеоперационный материал (фрагменты опухоли и фрагменты окружающей ее здоровой ткани) и пробы крови для дальнейшего анализа;

- Проведено выделение ядерной и митохондриальной ДНК с использованием набора для выделения ДНК Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research, США);

- Выполнена подготовка библиотек для таргетного секвенирования ДНК из опухоли и нормальной ткани с использованием панели праймеров AmpliSeq HotSpot Cancer Panel v2;

- Оптимизированы процедуры секвенирования библиотек ДНК из условно-нормальных и опухолевых тканей за счет варьирования режима секвенирования;

- Выполнена верификация мутаций, обнаруженных методом секвенирования нового поколения, с помощью выборочного повторного секвенирования образцов с использованием дополнительных праймеров и секвенирования по Сэнгеру.

В ходе выполнения проекта получены принципиально новые данные об использовании одновременного анализа геномных и транскриптомных данных при раке почки и раке молочной железы. Подобраны условия выделения нуклеиновых кислот. Разработана адаптированная методика приготовления библиотек ДНК для секвенирования, позволяющая существенно снизить затраты на данный процесс при сохранении выходных параметров (качество прочтения ДНК). Получены первичные данные о частоте встречаемости мутаций при раке молочной железы в исследуемой популяции. Полученные научные и технологические решения, разработанные методики являются принципиально новыми, соответствуют мировому уровню аналогичных работ и требованиям технического задания к выполняемому

проекту. При проведении исследований было использовано оборудование ЦКПНО ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» и уникальное научное оборудование для RPPA-анализа белковой экспрессии иностранного партнера – университета Земмельвейса, Венгрия. Опубликована статья в журнале «Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis», индексируемом в базах данных Scopus и Web of Science. Подана заявка на патент «Способ диагностики предрасположенности к раку молочной железы в русской популяции на основе ПЦР-ПДРФ». Результаты выполнения проекта представлены в СМИ и международных научных конференциях. Работы по Соглашению о предоставлении субсидии от 21 февраля 2018г. №14.586.21.0062 на этапе №1 Плана-графика исполнены надлежащем образом, в соответствии с техническим заданием на проведение исследований. Разработанная отчетная документация представлена согласно утверждённым Минобрнауки России «Методическим указаниям по оформлению отчётной документации». Научные исследования по данной тематике в России и мире находятся на начальной стадии и значительный вклад в ее развитие вносят работы авторов проекта. Экспериментальный и теоретический уровень ожидаемых результатов сопоставим с мировым, а по ряду позиций будет опережать отечественные и зарубежные разработки в смежных областях.

Иностранному партнеру Университету Земмельвейса – сотрудниками ВГУ были переданы для дальнейшего анализа протеома 30 образцов тканей почки и 100 образцов тканей молочной железы. Иностранном партнером был выполнен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей применение анализа на биочипах с обратной фазой для диагностических целей;

В обзоре представлены следующие аспекты:

1. Методы протеомного анализа в диагностических целях
2. Методы анализа протеома на основе антител
3. Протеомные базы данных

Иностранному партнеру были составлены методические указания по процедурам выделения и очистки белков из биологических образцов, процедурам анализа на биочипах с обратной фазой, методам биоинформатического анализа полученных данных.

Также иностранным партнером были разработаны методики количественного анализа экспрессии белковых продуктов генов, анализируемых панелью праймеров Hot Spot Cancer Panel с использованием платформы RPPA, и верификации полученных результатов выборочным повторным вестерн-блоттингом.

Методики были оптимизированы для работы с тканями почки; также специально для данного проекта был разработан модифицированный бензоназый буфер.

Принципиальная новизна работ, выполняемых иностранным партнером, заключается в использовании белковых биочипов с обратной фазой для разработки диагностической тест-системы, пригодной для использования в диагностике онкологических заболеваний.

Иностранный партнер произвел валидацию 25 антител, пригодных для использования в RPPA, против белков, входящих в панель AmpliSeq HotSpot Cancer Panel v2, а также подготовил банк лизатов из всех образцов, полученных от Воронежского государственного университета, пригодных для использования в RPPA