

**РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ОНКОМАРКЕРА  
ЦИТОКЕРАТИНА 19 В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ  
ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ**

**Несговорова Н.А. (ИТМО)**

**Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Аль-Шехадат Р.И.  
(ИТМО)**

**Введение.** Стандартная онкологическая операция, помимо резекции первичной злокачественной опухоли, включает обширное удаление регионарных лимфатических узлов (ЛУ). Необходимость проведения такой процедуры связана с тем, что ЛУ являются первым барьером для опухолевых клеток, распространяющихся от первичного очага. Злокачественные клетки, сохранившиеся в ЛУ, в дальнейшем распространяются по организму с током лимфы, формируя более отдаленные очаги метастазирования [1]. При сохранении ЛУ с метастазами возможно возникновение рецидива, однако радикальное удаление ЛУ может повлечь за собой тяжелые осложнения, ухудшающие качество жизни пациента (в частности, привести к развитию лимфостаза и лимфедемы) [2]. На ранних стадиях онкологического процесса возможно проведение избирательной диссекции ЛУ – в таких случаях необходимо непосредственно в ходе операции провести экспресс-диагностику наличия в них метастазов.

Классическим методом оценки состояния ЛУ является их гистологическое исследование. Данный способ диагностики характеризуется трудоемкостью, длительностью и высоким риском получения ложноотрицательных результатов (не исключается субъективность оценки, влияние на нее пробоподготовки и числа анализируемых срезов) [3]. Таким образом, ограничения существующего метода исследования ЛУ не позволяют проводить эффективную и быструю диагностику метастазов во время операции.

Решением этой проблемы является разработка тест-системы (набора реагентов) для экспресс-диагностики метастазов в лимфатических узлах. В основе разрабатываемой тест-системы лежит метод петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), позволяющий точно и быстро идентифицировать в пробах онкомаркер цитокератин 19.

**Основная часть.** Ген KRT19 не экспрессируется в лимфоидной ткани, но характеризуется высоким уровнем экспрессии в клетках опухолей эпителиального происхождения. Поэтому мРНК данного гена служит маркером для обнаружения их метастазов в лимфатических узлах [4]. В реакции LAMP, совмещенной с обратной транскрипцией, с данной мРНК образуется кодирующая ДНК (CDS), которая в дальнейшем амплифицируется благодаря наличию в реакционной смеси специфичных праймеров и Bst-полимеразы. Таким образом, для разработки праймеров необходимо проведение биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей CDS цитокератина 19. Для нахождения консервативных участков в наборе последовательностей, выгруженных из базы данных NCBI Nucleotide, был использован биоинформатический метод множественного выравнивания (алгоритмы Muscle и ClustalO). Кластеризация данных последовательностей осуществлялась методом DBSCAN по матрицам расстояний, рассчитанных с помощью программ множественного выравнивания. В результате все исследуемые нуклеотидные последовательности CDS цитокератина 19 были отнесены к одному кластеру, что свидетельствует об их высокой консервативности.

Консенсусная последовательность CDS цитокератина 19, полученная в результате множественного выравнивания, была использована для подбора специфичных праймеров. Для

дизайна праймеров была использована программа Lamprim, рассчитывающая их основные характеристики (длину, температуру плавления  $T_m$ , GC-состав, значения изменений свободной энергии  $\Delta G$  на 5' и 3' концах), а также способность к формированию шпилек и димеризации.

Полученные комплекты праймеров были протестированы в реакции петлевой изотермической амплификации. В качестве положительного образца использовалась генно-инженерная конструкция, представляющая собой плазмидный вектор, несущий вставку с нуклеотидной последовательностью CDS цитокератина 19.

**Вывод.** Был проведен биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей кодирующей ДНК (CDS) цитокератина 19. Получена консенсусная последовательность CDS цитокератина 19, на основании которой было подобрано 5 комплектов праймеров для петлевой изотермической амплификации (LAMP). Проведен скрининг праймеров в реакции LAMP, в результате которого был определен наиболее специфичный комплект для проведения дальнейших исследований по разработке тест-системы и оценке её аналитических характеристик.

*Исследование реализуется при поддержке гранта Фонда содействия инновациям, предоставленного в рамках программы «Студенческий стартап» федерального проекта «Платформа университетского технологического предпринимательства» (договор №1183ГССС15-L/87915 от 22 августа 2023 г.)*

#### **Список использованных источников:**

1. Ji, H., Hu, C., Yang, X. et al. Lymph node metastasis in cancer progression: molecular mechanisms, clinical significance and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther* 8, 367 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01576-4>
2. Soares, E. W., Nagai, H. M., Bredt, L. C., da Cunha, A. D., Jr, Andrade, R. J., & Soares, G. V. (2014). Morbidity after conventional dissection of axillary lymph nodes in breast cancer patients. *World journal of surgical oncology*, 12, 67. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-12-67>
3. Wang, Y. S., Ou-yang, T., Wu, J., Liu, Y. H., Cao, X. C., Sun, X., Fu, L., Liao, N., Yang, W. T., Zhong, W. X., & Lu, A. P. (2012). Comparative study of one-step nucleic acid amplification assay, frozen section, and touch imprint cytology for intraoperative assessment of breast sentinel lymph node in Chinese patients. *Cancer science*, 103(11), 1989–1993. <https://doi.org/10.1111/cas.12001>
4. Pina, H., Salleron, J., Gilson, P., Husson, M., Rouyer, M., Leroux, A., Rauch, P., Marchal, F., Käppeli, M., Merlin, J. L., & Harlé, A. (2022). Intraoperative prediction of non-sentinel lymph node metastases in breast cancer using cytokeratin 19 mRNA copy number: A retrospective analysis. *Molecular and clinical oncology*, 16(3), 58. <https://doi.org/10.3892/mco.2022.2491>