



Методы анализа молекулярно-генетических маркеров в онкологии



Актуальность темы

Развитие молекулярно-генетических методик стало революционным прорывом в онкологии. Эти методы позволяют определять индивидуальные особенности опухолей, выявлять редкие формы рака и подбирать эффективные персонализированные подходы к лечению.

Зачем нужны молекулярно-генетические маркеры в онкологии?

- *Повышение точности диагностики и профилактики.*
- *Возможность заранее оценить риск развития наследственных форм рака.*
- *Подбор оптимального протокола лечения, учитывающего генетические особенности каждой опухоли.*

Благодаря таким технологиям врачи способны предложить пациентам более эффективное и адресное лечение, что существенно улучшает прогнозы и качество жизни больных.

Понятие онкомаркеров

- Онкомаркеры — это вещества, вырабатываемые организмом в ответ на появление злокачественных клеток или самой опухоли. Их концентрация повышается в крови, моче или тканях, сигнализируя о возможном присутствии онкологического заболевания.

Биологическая роль онкомаркеров:

Диагностическая

- Обнаружение рака на ранних стадиях;

Прогностическая:

- Определение стадии заболевания и степени агрессивности опухоли;

Мониторинг:

- Наблюдение за эффективностью лечения и рецидивами.

Генетические и эпигенетические изменения опухолевых маркеров:

Генетические изменения: модификации, возникающие на уровне ДНК клетки:

Мутации: замена, потеря или вставка нуклеотидов, приводящие к изменению функций белков.

Амплификация генов: увеличение копий числа генов, чаще всего вовлечённых в рост и деление клеток.

Утрата гетерозиготности: утрата одной копии гена, что ведёт к потере контроля над клеточным ростом.

Эпигенетические изменения: изменения, влияющие на активность генов без изменения последовательности ДНК:

Метилирование ДНК: подавляет работу генов путём присоединения метильных групп к участкам ДНК.

Модификации гистонов: химические изменения гистонов, регулирующие упаковку ДНК и её доступность для транскрипции.

Нехроматиновая регуляция: микро-РНК и другие малые РНК, способные блокировать синтез белка.

CNV и LOH

CNV

- Вариации числа копий (CNV) — это изменения количества копий отдельных сегментов ДНК в геноме. В норме каждая хромосома представлена двумя копиями, но иногда возникает избыток или дефицит этих копий, что приводит к дисбалансу генетического материала.
- **Значимость в онкологии:**
- *Амплификация онкогенов: чрезмерное количество копий приводит к повышенной экспрессии онкогенов, стимулируя бесконтрольный рост клеток.*
- *Потеря копий супрессорных генов: снижение количества копий может привести к утрате способности контролировать рост клеток и предотвращать образование опухолей.*

LOH

- LOH — это потеря генетического разнообразия в диплоидном организме, когда теряется одна копия гена, что ведет к выраженному доминированию другой копии. Обычно проявляется потерей нормальной копии гена-супрессора опухолей.
- **Значимость в онкологии:**
- *Потеря активной копии гена-супрессора (например, TP53, PTEN) способствует прогрессированию опухоли.*
- *Частая причина потери гомозиготности — случайные события или механизмы нестабильности ДНК, что связано с развитием агрессивных форм рака.*

Метилирование ДНК как фактор развития онкологии

Суть явления:

- Метилирование ДНК — это химическая модификация ДНК путем добавления метильной группы ($-\text{CH}_3$) к определенным основаниям (обычно цитозину). Данный процесс регулирует активность генов, контролируя их включение или выключение.

Механизм в онкологии:

Гипометилирование:

- Распространённое явление в онкологии, связанное с ослаблением репрессорного эффекта и активацией мобильных элементов генома, способствующих образованию опухолей.

Гиперметилирование:

- Чаще встречается в промоторных регионах генов-супрессоров опухолей, приводя к снижению их экспрессии и нарушению сдерживающих факторов.

EGFR, KRAS, BRAF как ключевые гены, играющие центральную роль в сигнальных путях, регулирующих деление клеток.

EGFR

- Регулятор рецептора эпидермального фактора роста. Мутации приводят к постоянному сигналу деления клеток, вызывая неконтролируемый рост опухоли.

KRAS

- Кодировывает белок, передающий сигналы от мембранных рецепторов внутрь клетки. Активирующие мутации ведут к постоянному росту клеток.

BRAF

- Аналогично KRAS, участвует в передаче сигналов роста и выживания. Известны мутации, провоцирующие активный рост опухолей.

Общие подходы к анализу молекулярно-генетических маркеров:

Извлечение ДНК:

- выделение генетического материала из биологической пробы (кровь, моча, слюна).

Амплификация:

- размножение выбранного участка ДНК для повышения чувствительности теста (методом ПЦР или RT-ПЦР).

Гибридизация:

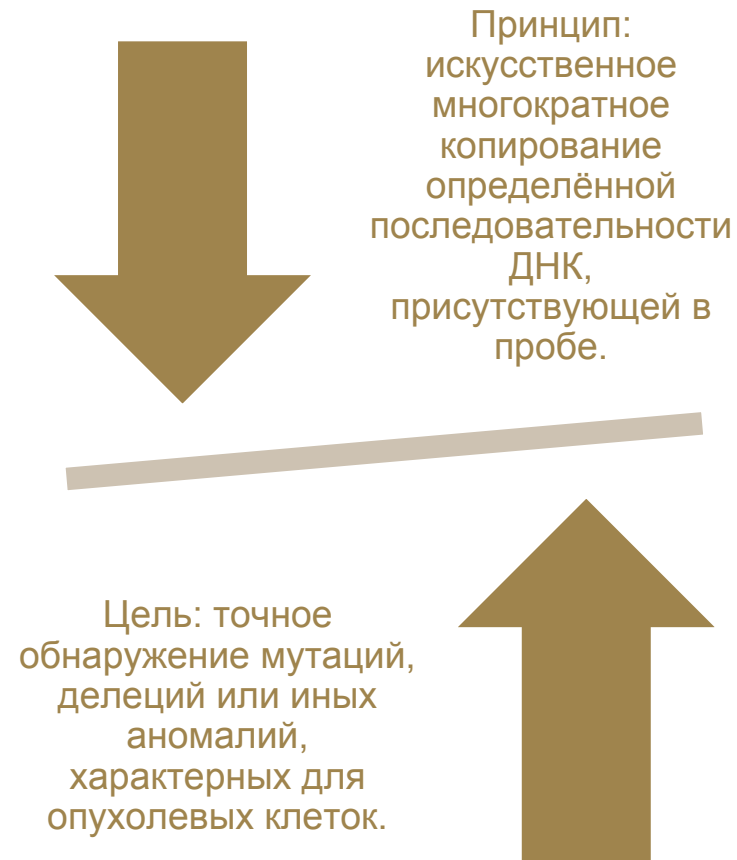
- соединение меченых зондов с целевыми последовательностями для обнаружения искоемых генов или мутаций.

Секвенирование:

- определение точной последовательности нуклеотидов в исследуемых генах, позволяющее обнаружить мутации и другие изменения.

ПЦР

- Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) является ключевым инструментом для диагностики молекулярно-генетических маркеров в онкологии. Его суть заключается в следующем:



ПЦР

Преимущества ПЦР-диагностики:

Высокая чувствительность и специфичность.

Быстрота исполнения анализа.

Универсальность применительно ко многим видам опухолей.

Применение ПЦР в онкологии:

Обнаружение мутаций в генах KRAS, BRAF, EGFR, определяющих стратегию лечения.

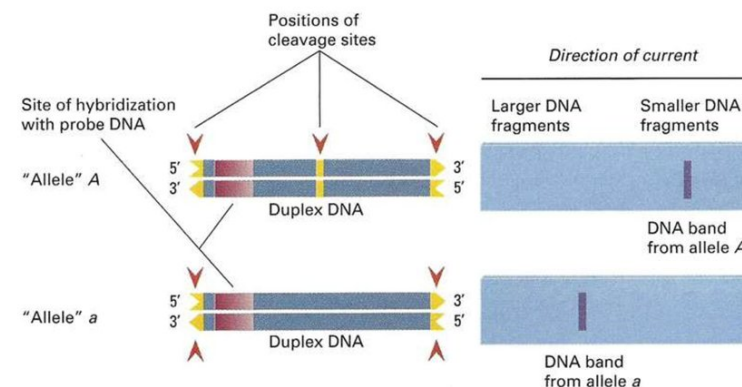
Контроль за динамикой заболевания и результатами терапии.

Ранняя диагностика наследственных форм рака (мутации в генах BRCA1/2).

RFLP-анализ

- RFLP (англ. Restriction Fragment Length Polymorphism) — это метод, основанный на различиях в длине фрагментов ДНК, возникающих после разрезания специальными ферментами — эндонуклеазами рестрикции. Если участок ДНК изменяется (мутирует), то меняется длина фрагмента, что легко фиксируется электрофорезом.

RFLP (ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)



Как RFLP-анализ применяется для выявления онкомутаций?

Идентификация мутаций

- используется для обнаружения мутаций в важных онкогенах или генах-супрессорах опухолей.

Определение генетического статуса

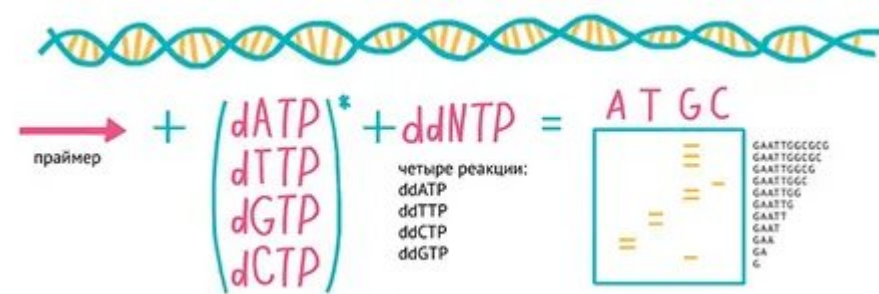
- помогает подтвердить наследственную природу опухолей (например, синдром Линча, связанный с дефектами генов репарации ДНК).

Оценка паттернов мутации

- полезно для мониторинга изменений в ходе лечения и диагностики рецидивов.

Секвенирование по Сенгеру

- **Суть метода:**
- Секвенирование по Сенгеру (также известное как метод терминаторов) — классический метод прямого прочтения последовательности ДНК, разработанный Фредериком Сенгером в конце XX века. Заключается в поэтапном удлинении цепи ДНК с добавлением специальных маркировочных оснований, позволяющих визуально фиксировать последовательность нуклеотидов.



Особенности применения секвенирования по Сенгеру в онкологии:

Высокая точность

- метод даёт достоверные результаты при изучении небольших участков ДНК, позволяя чётко зафиксировать единичные мутации (SNV).

Ограниченный масштаб

- работает лишь с небольшими фрагментами (до 1000 пар оснований), ограничивая масштабы анализа крупных геномов.

Широко используемый референс

- многие научные базы содержат стандарты, проверенные данным методом, что делает его удобным для сравнения результатов.

NGS как метод диагностики молекулярно-генетических маркеров в онкологии

NGS (Next-Generation Sequencing) — это современная технология массового параллельного секвенирования ДНК, позволяющая одновременно анализировать миллионы коротких фрагментов ДНК, что значительно ускоряет процесс диагностики.

Практическое применение:

Определение множественных мутаций в опухолях для выбора персонализированной терапии (таргетная терапия, иммунотерапия).

Картирующая диагностика мутаций, ассоциированных с редкими формами рака.

Детальное понимание генетической архитектуры опухоли, необходимой для предиктивного моделирования поведения заболевания.

Ключевые преимущества NGS в онкологии:

Одновременный анализ множества генов:

- изучение десятков или сотен генов за одну процедуру.

Быстрая обработка больших объёмов данных:

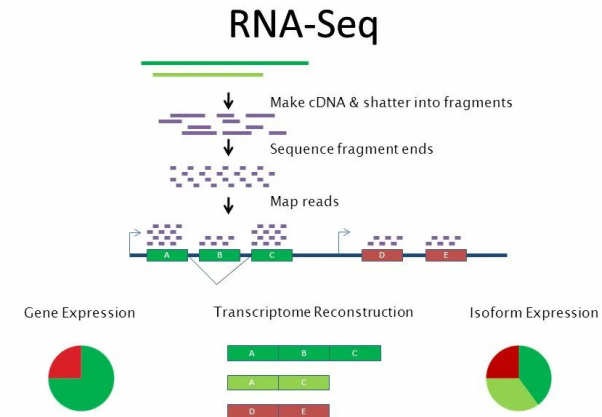
- ускоренное получение полного генетического портрета опухоли.

Высококчувствительность:

- возможность выявления редких мутаций и субклональных изменений.

RNA-Seq как метод диагностики молекулярно-генетических маркеров в онкологии

- RNA-Sequencing (RNA-Seq) — это метод, позволяющий глубоко изучить весь репертуар РНК-клеток (транскриптом), раскрывающий уровни экспрессии генов и разнообразие альтернативных сплайсингов мРНК.
- **Примеры использования:**
- Анализ опухолей для выявления ключевых путей активации и потенциальных мишеней для новой терапии.
- Изучение сложных случаев, когда стандартные анализы недостаточны для полноценного представления картины заболевания.



Особенности применения RNA-Sequencing в онкологии:

Комплексный анализ транскриптома:

- одновременное изучение уровней экспрессии тысяч генов, обеспечивающих представление о функционировании клеток опухоли.

Выявление необычных событий:

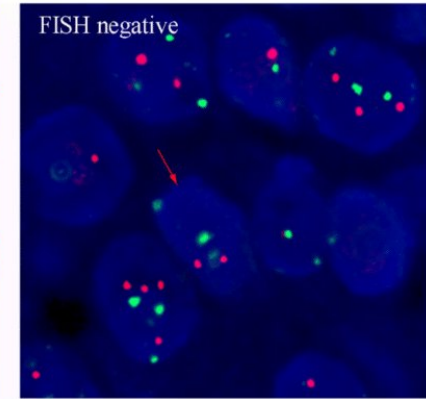
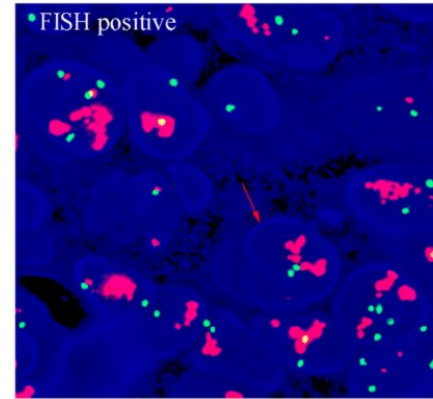
- возможность обнаружить необычные изоформы РНК, которые могут стать новыми потенциальными мишенями для таргетной терапии.

Профилирование циркулирующих опухолевых клеток:

- прямое чтение транскриптома клеток опухоли, находящихся в кровотоке, облегчает диагностику метастазов и оценку прогрессии заболевания.

FISH-гибридизация как метод диагностики молекулярно-генетических маркеров в онкологии

FISH (fluorescence in situ hybridization) — это техника, позволяющая наблюдать местоположение и число копий определенных генов или хромосомных участков прямо в ядрах клеток. Используется специальные флюоресцентные зонды, комплементарные целевой ДНК, которые подсвечиваются, демонстрируя расположение нужных участков.



FISH-гибридизация как метод диагностики молекулярно-генетических маркеров в онкологии

Почему важно в онкологии?

Позволяет быстро и наглядно определить количественные и качественные изменения в генах, участвующие в формировании опухолей.

Помогает в диагностике редких мутаций и перестановок генов, связанных с онкологическим процессом.

Часто используется для подтверждения наличия специфичных перестроек (например, транслокаций в гематологических опухолях).

Примеры:

Транслокации:

- например, $t(9;22)(q34;q11)$ в хроническом миелолейкозе.

Аплификации:

- увеличение копий гена HER2/NEU в раке молочной железы.

Потеря гетерозиготности:

- утрата второй здоровой копии гена-супрессора, усиливающая потенциал образования опухоли.

Суть метода:

Comparative Genomic Hybridization (CGH) — это аналитический метод, позволяющий детально охарактеризовать изменения в количестве копий целых хромосом или их частей. Основная цель — сравнение геномов здоровых и опухолевых клеток для выявления областей амплификаций и потерь.

Чем полезен в диагностике онкологии?

Детализированный анализ изменений в геноме:

- позволяет увидеть крупные изменения в геноме (амплификацию, потерю участков), потенциально играющие ключевую роль в канцерогенезе.

Поддерживает персонализированный подход:

- предоставляет дополнительную информацию о генетическом профиле опухоли, необходимую для подбора таргетной терапии.

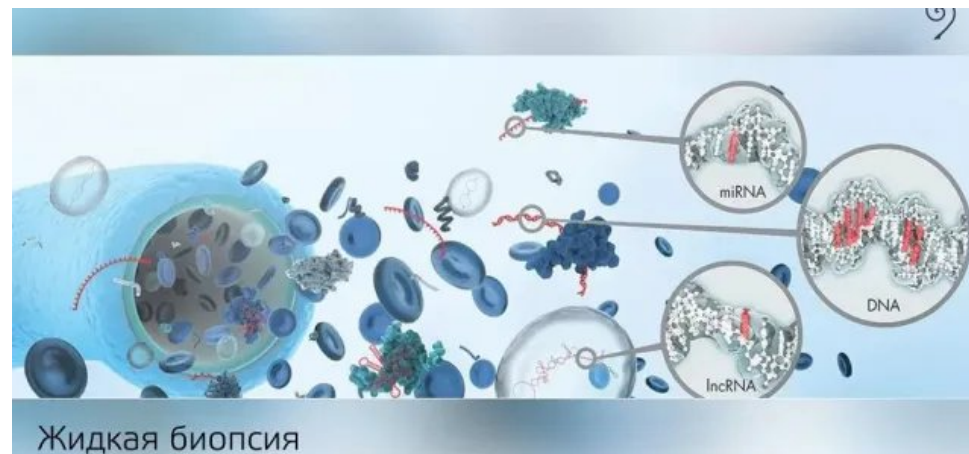
Выявляет редко встречаемые мутации,

- пропускаемые классическими методами.

Жидкостная биопсия

Суть метода

Жидкостная биопсия — это инновационный метод диагностики, основанный на обнаружении в жидкостях организма (преимущественно кровь) внеклеточного генетического материала, выделяемого опухолевыми клетками.



Жидкостная биопсия

Зачем это нужно?

Минимальная инвазивность:

- простая процедура забора крови вместо традиционной инвазивной биопсии.

Ранняя диагностика:

- возможность обнаружения микрометастазов задолго до проявления симптомов.

Мониторинг прогресса:

- постоянный контроль за состоянием опухоли и реакцией на лечение.

Какие материалы ищут?

Микроскопические частицы разрушенных опухолевых клеток.

Опухолевые экзосомы.

Свободная циркулирующая ДНК (ctDNA).

Проблемы и ограничения диагностики раковых заболеваний:

Стоимость:

- Современные методы диагностики (секвенирование, FISH, жидкостная биопсия) требуют значительных финансовых ресурсов, ограничивая их массовое внедрение.

Сложность интерпретации:

- Многие генетические изменения сложно интерпретировать однозначно, поскольку взаимосвязи между отдельными мутациями и поведением опухоли остаются сложными для трактовки.

Необходимость IT-анализа:

- Высокопроизводительные методы диагностики создают огромные объёмы данных, требуя мощного программного обеспечения и квалифицированных биоинформатиков для анализа.

Перспективы развития методов диагностики раковых заболеваний:

Искусственный интеллект:

- машинное обучение и большие данные позволят быстрее и точнее обрабатывать результаты генетических тестов, снижая затраты и сокращая сроки диагностики.

Иммуноонкология:

- углубленное изучение иммунной системы и её реакций позволит создать более действенные инструменты диагностики и оценки иммунного ответа на опухоль.

Повышение точности:

- дальнейшее развитие технологий секвенирования и FISH обеспечит больше возможностей для персонализированной диагностики и выбора подходящего лечения.

Выводы

Важность молекулярно-генетических маркеров:

- молекулярно-генетические маркеры стали важнейшими компонентами диагностики и прогнозирования онкологических заболеваний, обеспечивая персонализированный подход к каждому пациенту.

Многообразие методов диагностики:

- существует множество методов (ПЦР, секвенирование, FISH, жидкостная биопсия), каждый из которых обладает своими преимуществами и ограничениями, необходимыми для комплексной оценки ситуации.

Перспективы будущего:

- искусственный интеллект, иммуноонкология и совершенствование методов диагностики обещают качественно новый этап в диагностике и лечении онкологических заболеваний.

Спасибо за внимание!