

**Молекулярная генетика  
канцерогенеза:  
протоонкогены, онкогены,  
опухолевые супрессоры,  
мутаторные гены.  
Молекулярная диагностика  
онкологических  
заболеваний.**

**Корсакова И.И.**

## **Опухолевый процесс как биологическое явление**

**Как причина смерти населения рак занимает второе место после сердечно-сосудистых болезней. Существует более 100 видов рака, более 50 % от всех впервые диагностируемых случаев составляют пять из них: рак легкого, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы и матки.**

**В зависимости от способности к распространению опухоли делят на доброкачественные, или локальные, не обладающие способностью прорасти в соседние ткани, и злокачественные, способные к инвазии и метастазированию в другие органы.**

**Опухолевый процесс** - это процесс, сопровождающийся прибавлением клеточной массы. Для новообразований характерен автономный тип роста. В норме количество клеток регулируется посредством точной балансировки двух противоположных процессов - клеточного деления и клеточной элиминации. При онкологическом заболевании прибавление клеточной массы опережает клеточную гибель либо за счет активации процессов пролиферации, либо вследствие угнетения процессов апоптоза, а чаще всего - при сочетанном нарушении этих процессов.

**Канцерогенез** – комплексный многоступенчатый процесс, включающий изменения не менее чем в 10 генетических факторах, каждый из которых является скоростьюлимитирующим.

В организме носителя каждая стадия процесса представляет собой физиологический барьер, который должен быть преодолен клеткой, прогрессирующей в сторону малигнизации (злокачественная трансформация). Существование множественности барьеров указывает на то, что малигнизация – явление редкое.

В организме человека 1015 типов клеток. В течение жизни происходит их обновление в объеме, равном 10 объемам человеческого тела. Из этого становится понятным, что только тонкая сбалансированность процессов пролиферации, дифференцировки и апоптоза позволяет поддерживать нормальное развитие и функционирование всех органов и тканей.

Пролиферация обеспечивает воспроизведение клеток, дифференцировка – приобретение ими индивидуальных черт и способности к специализированным видам деятельности, а апоптоз – разрушение старых и поврежденных клеток.

Рак представляет собой совокупность генных болезней, характеризующихся неконтролируемой клеточной пролиферацией.

## Опухолевый процесс как биологическое явление

На протяжении всего XX века ученые пытались сформулировать, какие конкретные признаки отличают опухолевые клетки и ткани от их нормальных предшественников. Прогресс в данной области, представляющей основу для разработки направлений противоопухолевой терапии, затруднялся биологическим разнообразием проявления новообразований. Тем не менее к настоящему времени удалось выделить и классифицировать несколько четких, подкрепленных молекулярно-генетическими данными тенденций. Наиболее ясное обобщение этих признаков представлено в работе основоположников молекулярной онкологии D. Hanahan и R. Weinberg, появившейся на страницах журнала Cell (№ 1 за 2000 г.). По мнению авторов, все или почти все опухоли характеризуются несколькими неотъемлемыми чертами.

# Характеристика опухолевых клеток

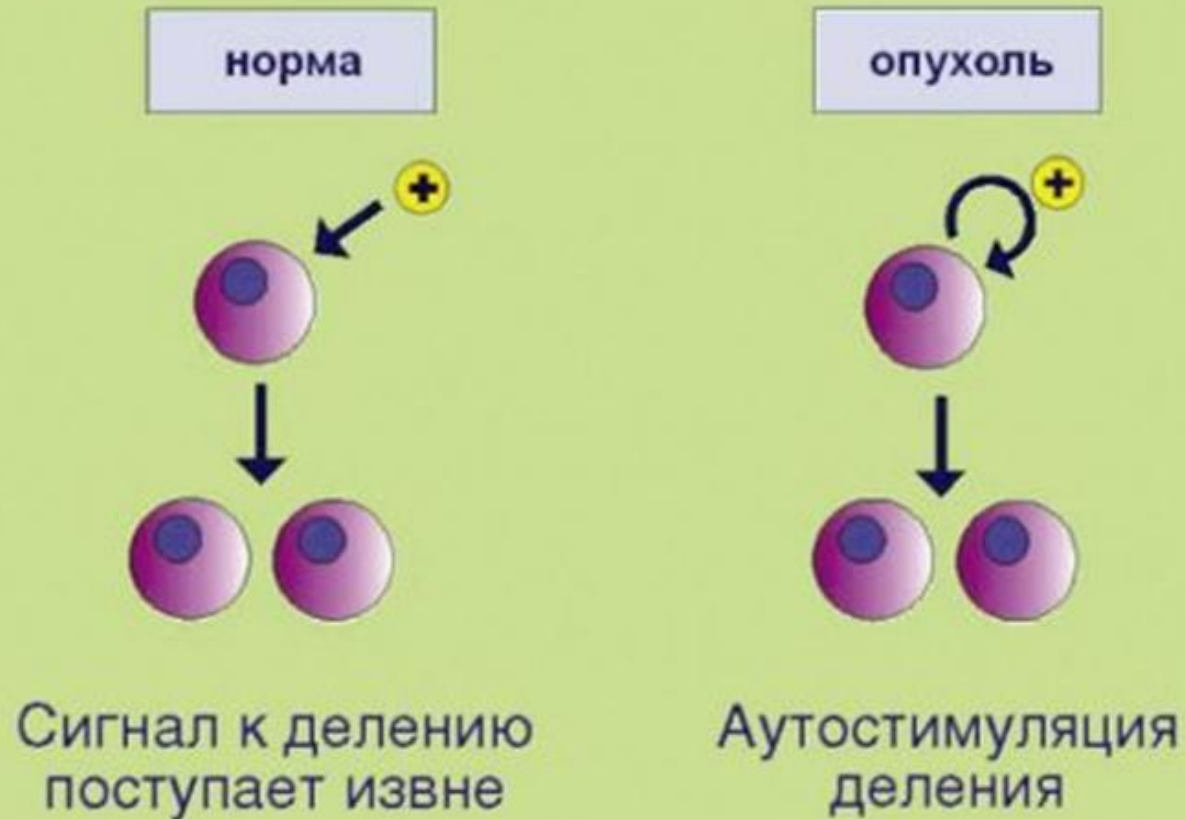
**1. Самодостаточность в отношении сигналов пролиферации, связанная с аутопродукцией факторов роста, соответствующих рецепторов или других компонентов сигнального промитотического каскада**

**Существенно, что нормальная клетка никогда не делится сама по себе; для запуска пролиферативной программы необходим сигнал извне, доставляемый эндокринной системой (гормоны), паракринными механизмами (тканевые факторы роста) или через синаптические окончания нейронов (нейротрофика).**

**Таким образом, увеличение количества клеток в норме происходит лишь в том случае, если многоклеточный организм-хозяин продуцирует сигналы к наращиванию клеточной массы.**

**Трансформированная клетка продуцирует подобные сигналы сама для себя, вне зависимости от потребностей организма, что и приводит к безостановочному делению опухолевого клона.**

## Характеристика опухолевых клеток



**Автостимуляция пролиферативного сигнала**

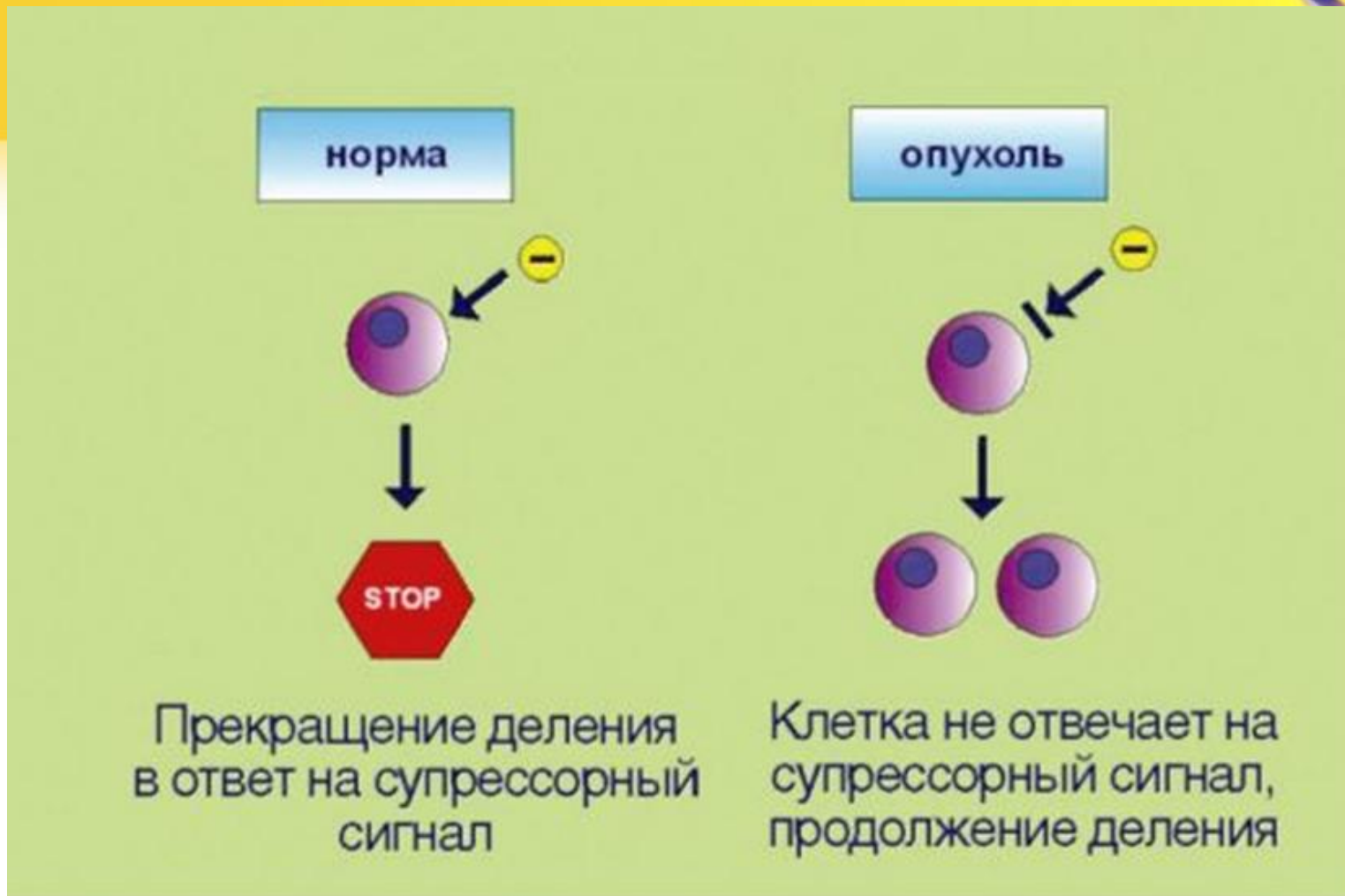
# Характеристика опухолевых клеток

**2. Потеря чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации, обусловленная инактивацией супрессорных (антимитотических) белков**

**Клоны, обладающие аномальной способностью к аутоstimуляции пролиферативного каскада, могут возникать в организме достаточно часто, что связано с постоянным мутационным процессом в клетках организма. Однако все многоклеточные представители живой природы выработали в процессе эволюции несколько уровней защитных систем, препятствующих несанкционированному накоплению клеток. В случае появления клеток со способностью к аутокринной стимуляции деления организм хозяина продуцирует сдерживающие сигналы, доставляемые к клеткам в виде гуморальных факторов и направленные на прекращение пролиферации.**

**Трансформированные клетки в отличие от нормальных утратили способность к восприятию таких сигналов, стали нечувствительны к супрессорным воздействиям.**

# Характеристика опухолевых клеток



**Потеря чувствительности к сигналам,  
прекращающим клеточное деление**



# Характеристика опухолевых клеток

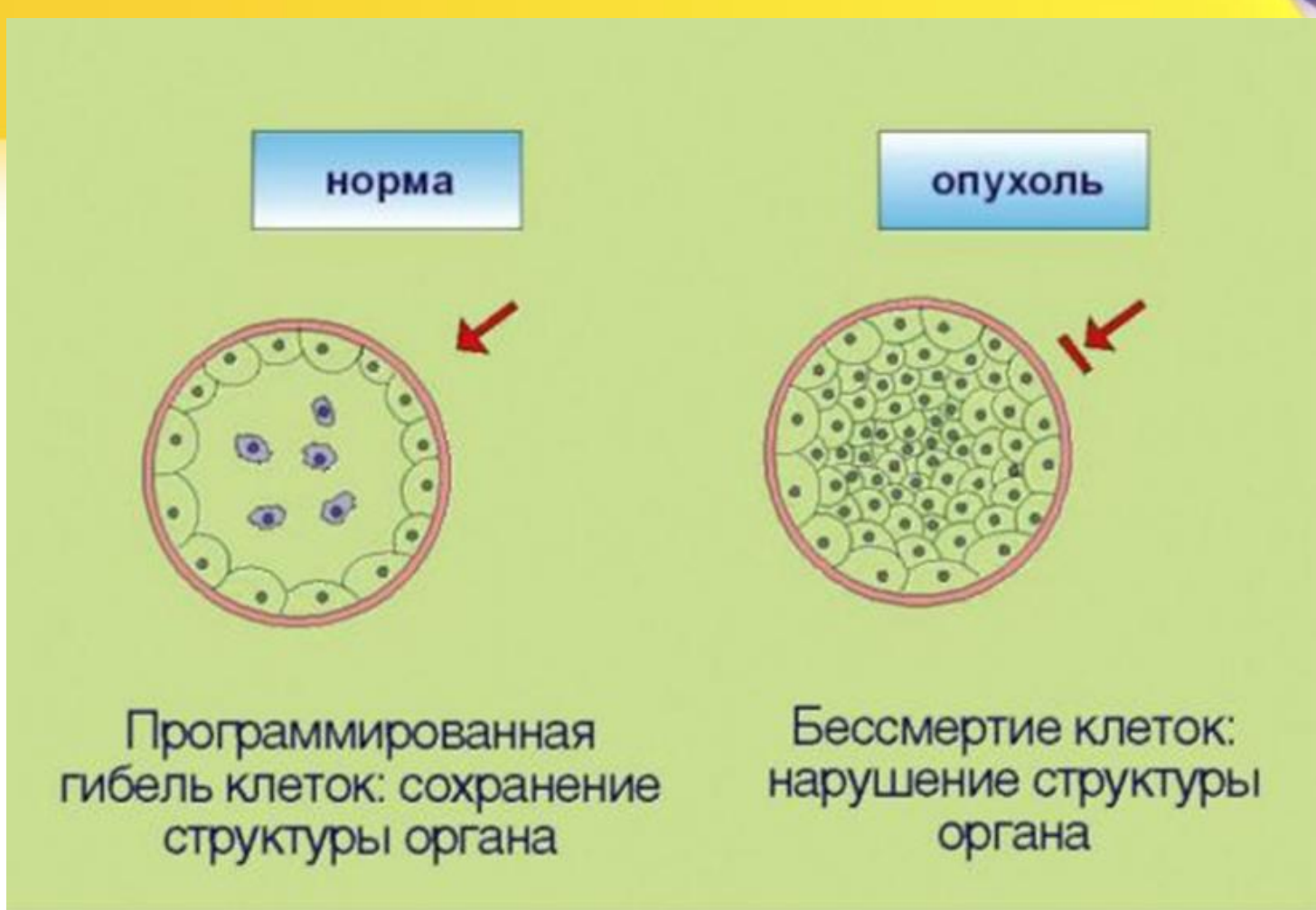
**3. Замедление процессов программируемой клеточной гибели, опосредованное дисбалансом биохимической регуляции процессов апоптоза**

Принято выделять 2 основные разновидности клеточной смерти: непрограммируемая и программируемая.

Непрограммируемая гибель клеток (некроз) происходит в результате выраженных неблагоприятных воздействий (гипоксия, ожог и т.д.). Подобное событие может негативно отражаться на структуре и функции органа и сопровождаться формированием рубцовой ткани.

Программируемая клеточная гибель в отличие от некроза является управляемым, энергозатратным процессом, направленным на сохранение и поддержание морфофункциональных характеристик органов и тканей. Наиболее изученная разновидность программируемой клеточной гибели - апоптоз - обеспечивает «плановую» элиминацию клеток. Помимо этого клетка способна распознавать собственные повреждения ДНК и другие биохимические изменения, представляющие угрозу с точки зрения злокачественной трансформации, и запускать «суицидную» программу, приводящую к самоуничтожению потенциально опасных клеток. Раковые клетки утратили способность к самоэлиминации, сохраняют жизнеспособность при наличии повреждений ДНК и стрессовых условий существования.

# Характеристика опухолевых клеток



**Иммортализация (бессмертие)**

# Характеристика опухолевых клеток

4. Неограниченный репликативный потенциал клеток (преодоление «лимита Хэйfliка»), сопряженный с реактивацией экспрессии фермента теломеразы и как следствие отсутствием физиологического укорачивания теломер.

В многоклеточных организмах существует еще один уровень защиты: ограничение репликативного потенциала делящихся клеток: нормальные клетки могут делиться не более 100-150 раз, после чего весь клон утрачивает возможность к самовоспроизведению (лимит Хэйfliка). Это лежит и в основе биологических механизмов старения: репликативный потенциал клеток уменьшается с возрастом индивидуума.

Преодоление лимита Хэйfliка является необходимым условием злокачественной трансформации. В лабораторных условиях только опухолевые клетки могут подвергаться многолетнему культивированию, в то время как долгосрочные культуры нормальных клеток получить не удастся.

Неограниченный репликативный потенциал опухолевых клеток принято объяснять активацией фермента **теломеразы**, которая компенсирует наблюдаемое в ходе клеточного деления физиологическое укорочение концевых участков хромосом. Теломераза, по-видимому, является одной из самых перспективных молекулярных мишеней для противоопухолевой терапии.

# Характеристика опухолевых клеток



**Неограниченный репликативный потенциал (бесконечное деление)**

## **Характеристика опухолевых клеток**

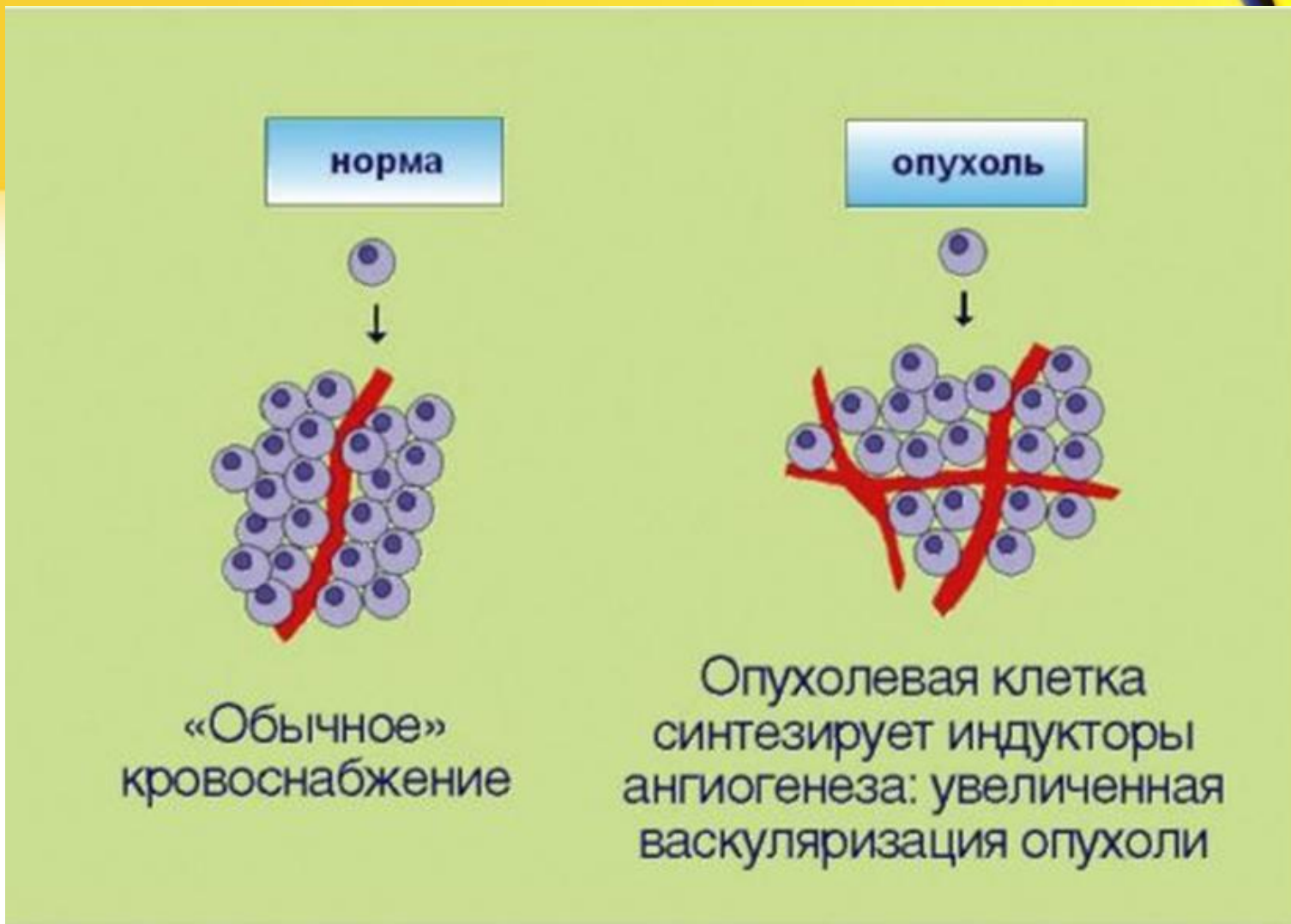
**5. Стимуляция процессов ангиогенеза в опухоли, вызванная экспрессией трансформированными клетками ангиогенных факторов и направленная на удовлетворение повышенных потребностей быстроделющихся неопластических компонентов в оксигенации.**

**Длительное время опухолевым клеткам приписывалась полная самодостаточность. Предполагалось, что трансформированный клон пролиферирует сам по себе, а все остальные элементы опухоли - строма, сосуды, фибробласты - являются лишь пассивными вспомогательными компонентами.**

**Доказано, что опухолевые клетки могут сформировать клинически распознаваемое новообразование лишь в том случае, если они продуцируют факторы неоангиогенеза. Формирование сосудистой сети опухоли происходит за счет активных, управляемых трансформированными клетками биологических процессов. К настоящему времени идентифицированы десятки факторов, провоцирующих или, наоборот, ингибирующих ангиогенез.**

**Разработка антиангиогенных препаратов считается одним из самых перспективных направлений в онкологии, т.к. они могут эффективно тормозить рост опухолевой массы без каких-либо побочных воздействий на организм.**

# Характеристика опухолевых клеток



**Индукция ангиогенеза**

# Характеристика опухолевых клеток

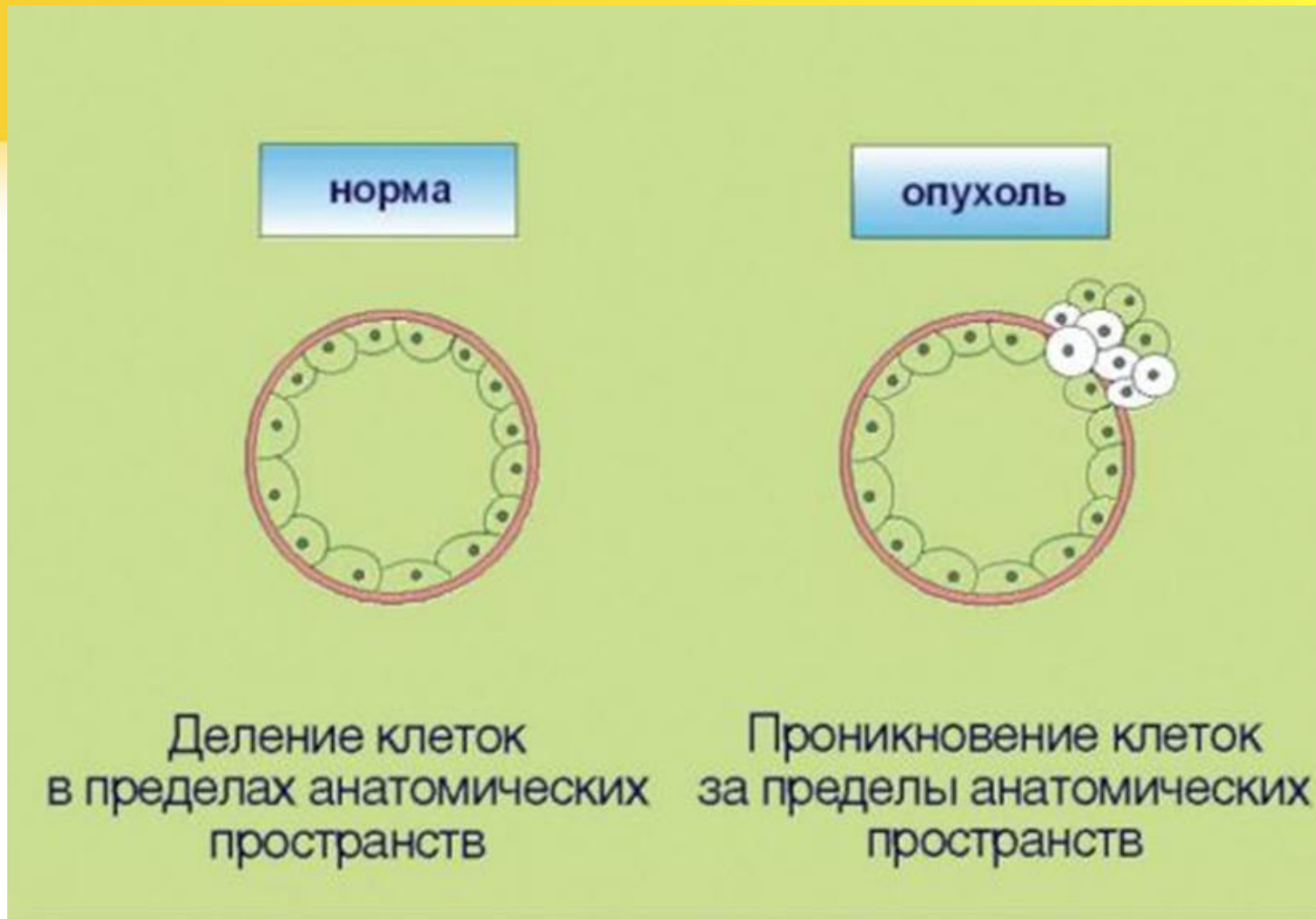
**6. Способность к инвазии и метастазированию, ассоциированная с продукцией опухолью гистолитических ферментов (протеаз), а также факторов, угнетающих локальный иммунитет.**

**Эта особенность злокачественной трансформации почти всегда упоминается как ключевой компонент опухолевого роста.**

**Внимание к инвазии и метастазированию связано с клинической значимостью данных процессов: именно они компрометируют результаты хирургического лечения рака и приводят к летальному исходу у онкологических больных.**

**Ни один из перечисленных признаков опухолевого роста не является достаточным для клинической манифестации онкологического процесса. В частности, процесс метастазирования нетрансформированных клеток характерен для заболевания женской репродуктивной системы - эндометриоза, которое никоим образом не является онкологической патологией.**

# Характеристика опухолевых клеток



**Инвазия и метастазирование**



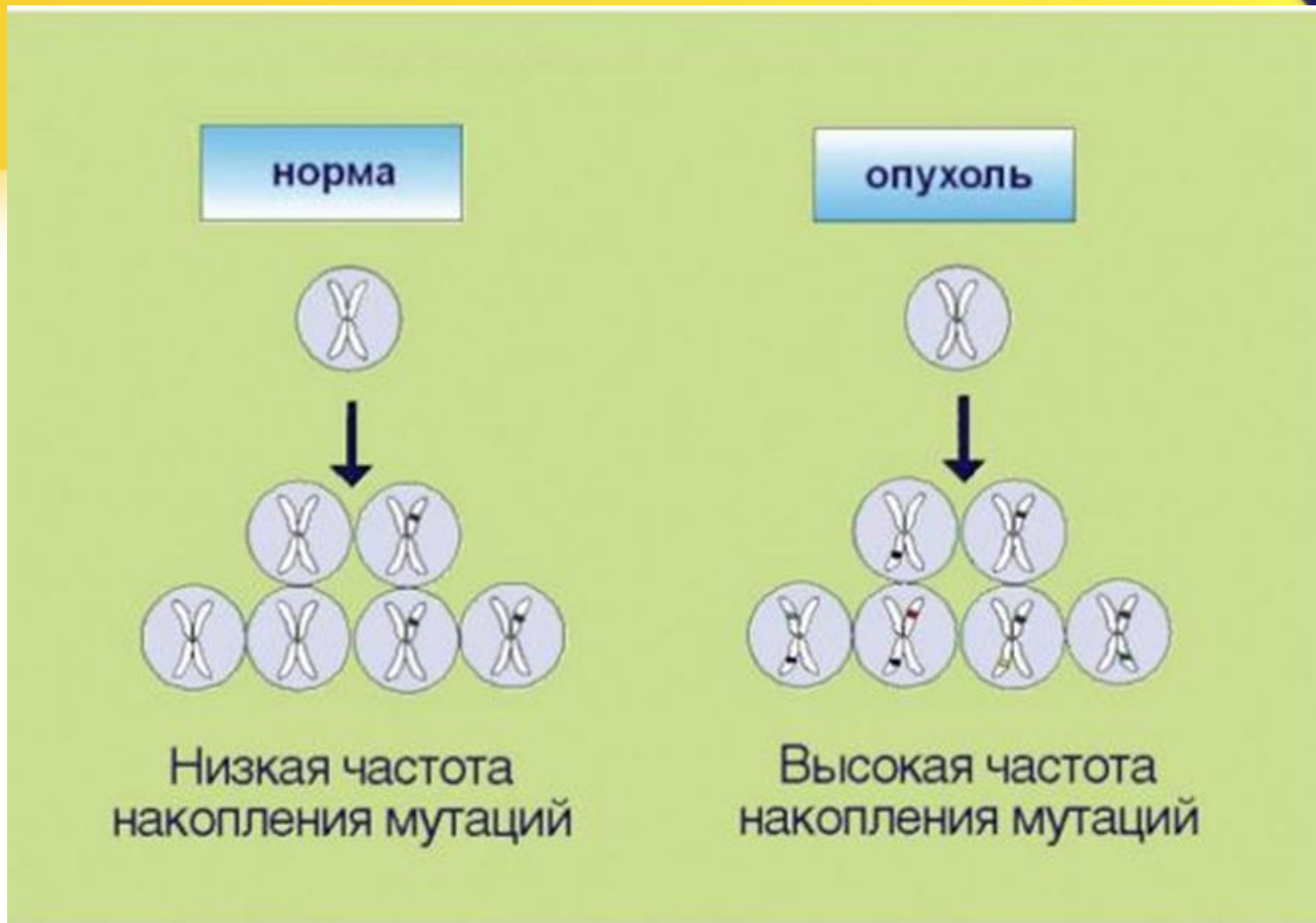
# Характеристика опухолевых клеток

**7. Геномная нестабильность, опосредованная инактивацией систем репарации ДНК и нарушениями в молекулярном контроле клеточного цикла.**

Для опухолевой клетки характерно ускоренное накопление мутаций, что отчасти связано со снижением эффективности процессов репарации ДНК. Подобная особенность приводит к чрезвычайной биологической пластичности новообразований, которые способны быстро приспосабливаться к изменяющимся условиям метаболизма и разнообразным лечебным воздействиям.

Геномная нестабильность является основным свойством опухолевых клеток, обеспечивающим «терапевтическое окно» при назначении цитостатических препаратов. Противоопухолевый эффект химиотерапии и радиации связан с индукцией повреждений ДНК, которые проявляются лишь в процессе клеточного деления; однако опухолевые клетки обладают большей чувствительностью к ДНК-повреждающим агентам, так как их способность к репарации химических изменений структуры нуклеиновых кислот ниже, чем у неизменных компонентов органов и тканей.

# Характеристика опухолевых клеток



**Геномная нестабильность**

# Характеристика опухолевых клеток

**8. Перестройка стромальных компонентов, создающая более благоприятные условия для эволюции злокачественного клона.**

Длительное время предполагалось, что элементы стромы образуют лишь пассивный каркас для размножающихся опухолевых клеток. Многочисленные факты свидетельствуют о том, что стромальные компоненты опухолей заметно отличаются от таковых в нормальных тканях; некоторые исследователи даже настаивают на том, что фибробласты, инфильтрирующие эпителиальные новообразования, содержат соматические мутации, отличные от таковых в опухолевых клетках и необходимые для жизнедеятельности злокачественного новообразования.

Продемонстрированы многочисленные случаи симбиоза трансформированных клеток и окружающих их фибробластов. В частности, независимость малигнизированного эпителия от внешних пролиферативных сигналов может обеспечиваться не аутокринной стимуляцией как таковой, а секрецией факторов роста фибробластами, населяющими опухоль. В свою очередь, эпителиальные клетки секретируют целый спектр биологически активных веществ, регулирующих адаптацию стромальных элементов к потребностям опухолевого роста.

# Характеристика опухолевых клеток



**Адаптация стромальных клеток к особенностям опухолевого роста**

# Характеристика опухолевых клеток

**Опухолевые клетки:**

- округлые или звездчатые;
- они крупнее нормальных;
- отличаются многообразием ядерных и клеточных форм;
- в них изменено ядерно-цитоплазматическое

**соотношение;**

- для них характерна полиплоидия (состояние, при котором ядро содержит три и большее число гаплоидных наборов хромосом) или анеуплоидия (число хромосом изменяется и становится не кратным гаплоидному набору).

- трансформированные клетки могут расти, не прикрепляясь к поверхности, в них снижена способность к адгезии, при этом теряет силу контактное

**торможение;**

- в опытах *in vitro* они растут, наползая друг на друга и образуя мультислой, в которых велико содержание митотических клеток.



# Характеристика опухолевых клеток

В метаболизме опухолевых клеток обнаруживается ряд характерных особенностей, которые существенно отличают их от нормальных:

- возрастает активность рибонуклеотидредуктазы и снижается катаболизм пиримидинов, увеличивается синтез ДНК и РНК;
- повышается скорость гликолиза, и увеличивается продукция лактата;
- изменяется соотношение изоферментного спектра, что позволяет опухолевым клеткам успешно конкурировать с окружающими тканями за жизненно важные метаболиты;
- появляются новые эмбриональные белки и антигены ( $\alpha$ -фетопротеин, карциноэмбриональный антиген и многие другие);
- изменяются состав и структура олигосахаридных цепей гликопротеинов и гликосфинголипидов плазматической мембраны, а следовательно ее проницаемость и заряд;
- секретируются некоторые металлопротеазы, коллагеназы, способствующие инвазии опухоли в соседние ткани и сосуды, факторы ангиогенеза, стимулирующие развитие сосудов;
- возрастает скорость синтеза и секреции гормонов и некоторых факторов роста.

## **Факторы, стимулирующие канцерогенез**

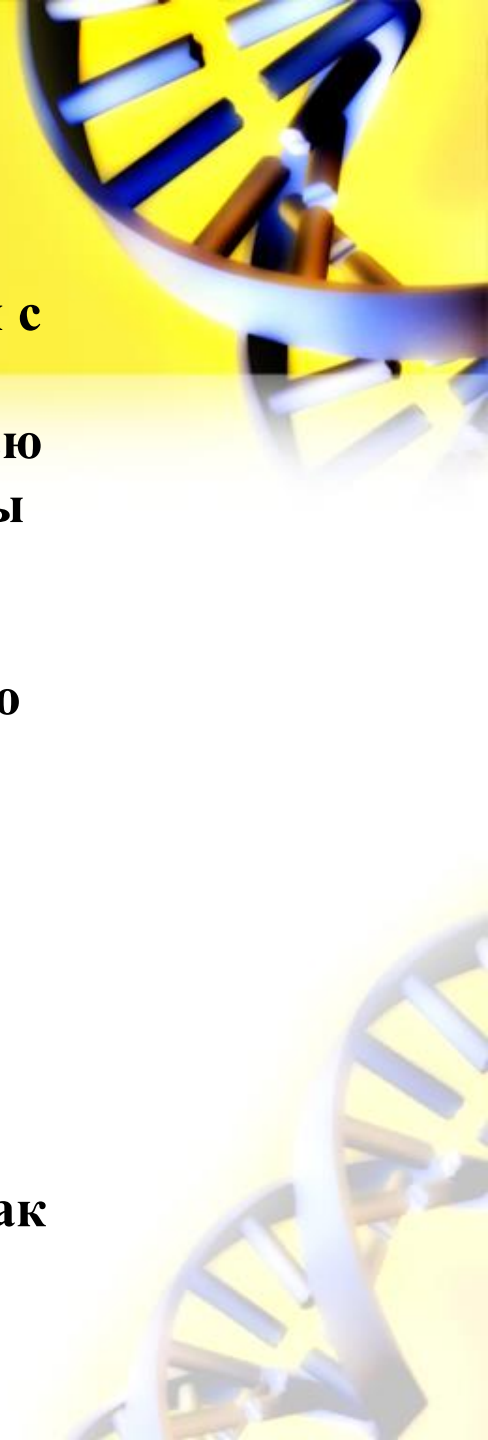
**Около 80 % случаев рака у людей являются результатом воздействия факторов окружающей среды, под которыми понимают:**

- стиль жизни (курение, производственные контакты с канцерогенами);**
- пищевые продукты (зерновые, зараженные плесенью *Aspergillus flavus*, пищевые добавки, содержащие нитриты и вторичные амины);**
- заболевания, увеличивающие риск развития опухолей (цирроз печени в ряде случаев ведет к развитию гепатоцеллюлярной карциномы, а язвенный колит – аденокарциномы толстой кишки и т.д.).**

**Склонность к опухолеобразованию может стимулироваться:**

- возрастом;**
- наследственными изменениями генома.**

**Например, предрасположенность к ретинобластOME или множественному полипозу толстой кишки наследуется как аутосомно-доминантный признак, а нестабильность хромосомной ДНК – как аутосомно-рецессивный.**



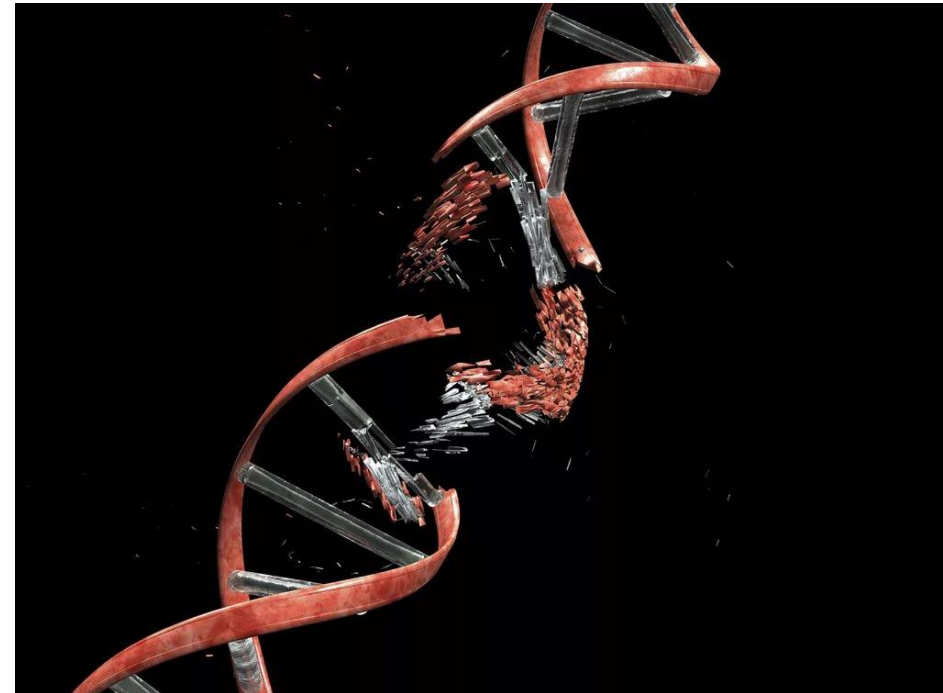
## Факторы, стимулирующие канцерогенез

Физические, химические и биологические воздействия, вызывающие трансформацию клеток, называют **канцерогенными воздействиями**. К ним относят:

- рентгеновские,  $\gamma$ - и УФ-лучи, которые оказывают как прямой повреждающий эффект на структуру ДНК за счет появления разрывов в нитях и нарушений в структуре азотистых оснований, так и не прямой, вызванный действием на макромолекулы свободно-радикальных форм кислорода, образующихся в тканях под воздействием облучения;
- химические вещества, некоторые лекарственные препараты, многие из которых сами по себе не являются канцерогенами, но превращаются в них, подвергаясь в печени воздействию ферментов универсальной системы детоксикации ксенобиотиков, нарушают функционирование генетического материала и вызывают возникновение неоплазм;
- ДНК- и РНК-содержащие вирусы, которые встраиваются в клеточный геном и экспрессируют гены и белковые продукты, вызывающие неопластическую трансформацию (ретровирусы, вирус герпеса, аденовирус и др.).



Основные классы химических канцерогенов



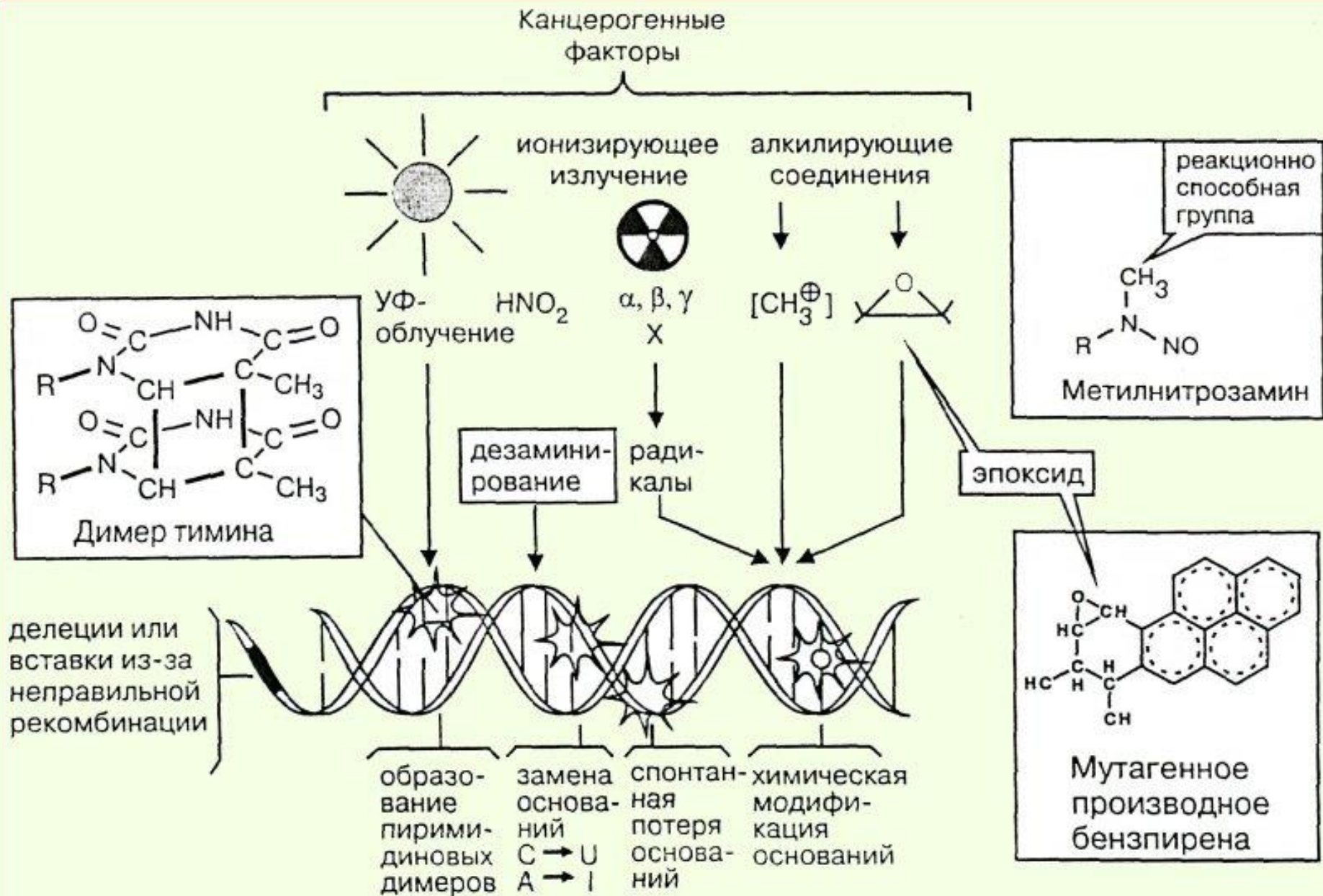
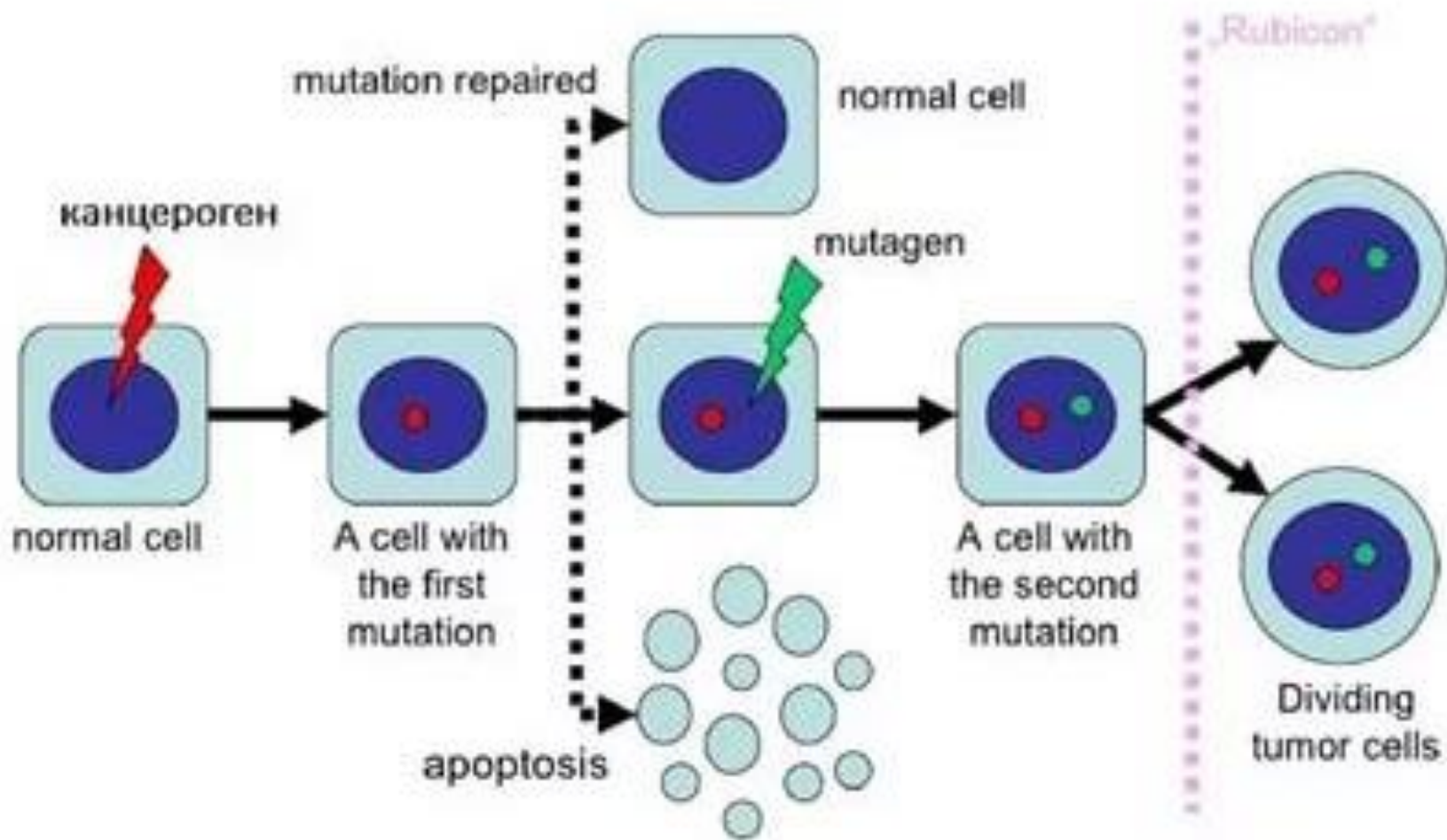


Рис. 15.2. Изменения структуры ДНК протоонкогена при действии канцерогенных факторов

# Канцерогенез



# МЕХАНИЗМ КАНЦЕРОГЕНЕЗА



# Теории канцерогенеза

До самого последнего времени количество «теорий рака» измерялось сотнями.

К наиболее значимым следует отнести вирусные, иммунологические, канцерогенные и гормонально-метаболические концепции, которые были предметом горячих споров в середине XX столетия.

Понимание природы опухолевого роста стало принимать более очерченные формы лишь в течение двух последних десятилетий прошлого века благодаря бурному развитию молекулярной онкологии.

Первый серьезный прорыв произошел в 1970-х годах, в процессе изучения молекулярных основ вирусного канцерогенеза. При проведении серии экспериментов, направленных на идентификацию «онкологически значимых» фрагментов генома вируса саркомы Рауса, выяснилось, что за всю картину злокачественной трансформации отвечает лишь один-единственный ген, который назвали онкогеном *src*.

Позже было установлено, что подобный принцип характерен для большинства известных онкогенных вирусов. Однако значение опытов на вирусах лимитировалось тем фактом, что данная разновидность опухолевого патогенеза наблюдалась только у животных (мышей, крыс, птиц), при этом причастности вирусов к опухолям у человека доказать не удавалось.

# Онкогенная теория рака

Разработка метода гибридизации нуклеиновых кислот привела к новому революционному открытию: оказалось, что все вирусные онкогены имеют гомологов в составе человеческого генома. Более того, данные гомологи являются необходимым компонентом клеточной жизнедеятельности; они отвечают за такие важнейшие процессы, как пролиферация, дифференцировка и т.д.

Венцом примерно 10-летней серии экспериментов стало доказательство факта активации онкогенов в опухолях (вследствие увеличения количества копий и/или функциональной модификации). К середине 1980-х годов онкогенная теория рака приобрела стройность.

Ее основные положения можно сформулировать следующим образом:

1. **Онкогеном** называется ген, который:
  - а) в норме оказывает активирующее влияние на процессы пролиферации и/или препятствует клеточной гибели;
  - б) активируется в опухолях;
  - в) проявляет трансформирующие свойства в экспериментах по трансфекции.

# Онкогенная теория рака



**2. Онкогены необходимы для нормального функционирования (обновления) тканей; их работа находится под строгим контролем сигнальных систем организма.**

**Соматическая мутация в онкогене приводит к независимости клетки от внешних регулирующих влияний, т.е. клеточный клон, находясь в условиях аутоstimуляции, приобретает способность к неконтролируемому размножению. Генетические повреждения в онкогенах могут возникать вследствие случайного мутационного процесса, однако вероятность мутаций существенно повышается при увеличении канцерогенной нагрузки.**

**3. При вирусном канцерогенезе у животных вирус содержит уже активированную версию онкогена и, таким образом, является лишь транспортной формой последнего. У человека, напротив, большинство опухолей возникает за счет активации (мутации) эндогенных онкогенов.**

**4. Активация одного онкогена почти всегда компенсируется. Процесс злокачественной трансформации требует сочетанных нарушений в нескольких онкогенах.**

# Онкогены

К настоящему моменту идентифицированы сотни продуктов экспрессии онкогенов.

Они принадлежат к самым разнообразным классам белков и могут выполнять широкий спектр клеточных функций.

Наиболее хорошо изучены протеинкиназы - ферменты, осуществляющие регуляцию активности белков-мишеней посредством фосфорилирования.

Протеинкиназы делятся на 2 класса: тирозинкиназы и серин-треониновые киназы.

**Тирозинкиназы** несколько легче поддаются изучению, поэтому сведения об их причастности к возникновению опухолей представлены в достаточно обширном объеме. К наиболее исследованным тирозинкиназам относятся мембранные белки EGFR, HER2, KIT, цитоплазматические ферменты SRC, ABL и т.д.

В качестве примеров **серин-треониновых киназ**, вовлеченных в процесс онкогенеза, можно привести белки AKT, PKC и т.п.

Большую известность получили работы, посвященные изучению **ГТФаз**, особенно онкобелков семейства RAS.

Значительное число известных онкогенов кодирует **регуляторы транскрипции**.

К наиболее изученным **ядерным онкобелкам** относятся MYC, FOS и JUN.



# Протоонкогены

Исследования структуры генома млекопитающих и человека показали, что в эукариотических клетках гены, кодирующие факторы роста, рецепторы факторов роста, транскрипционные факторы и другие белки, вовлеченные в регуляцию роста и дифференцировки, являются структурными аналогами онкогенов, т.е. теми исходными генами, из которых онкогены возникли.

Эти нормальные клеточные гены, прототипы онкогенов, не обладают трансформирующими свойствами и их называют **протоонкогенами**.

Протоонкогены кодируют белки, стимулирующие пролиферацию клеток.



# Антионкогены

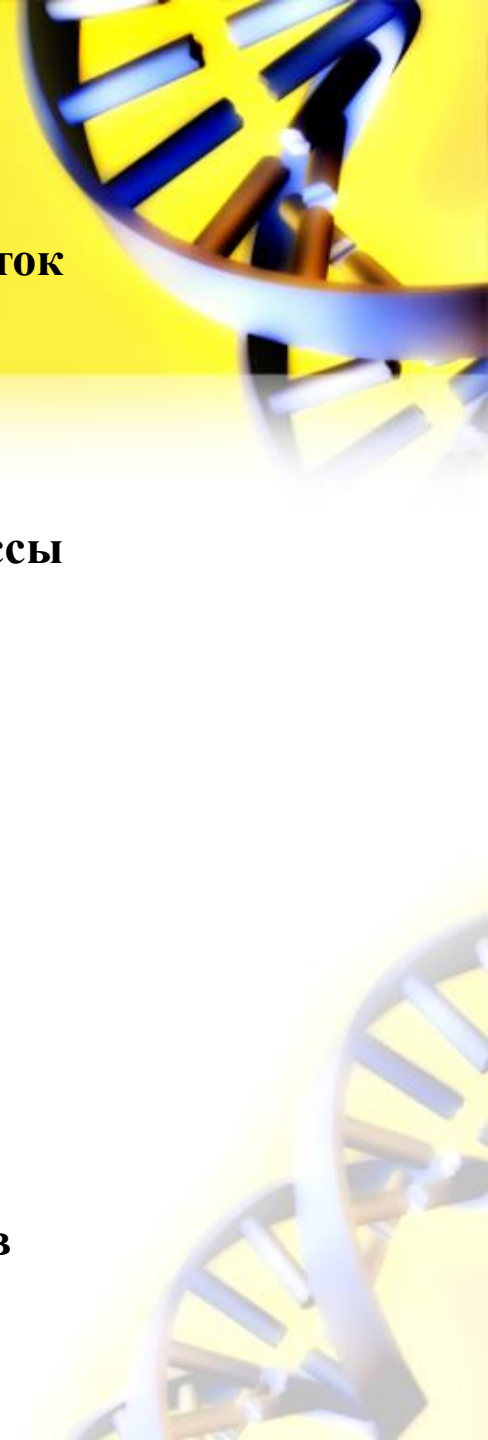
Существуют и механизмы сдерживания клеточного роста. Молекулярные основы негативной регуляции количества клеток стали понятны в связи с открытием антионкогенов.

**Антионкогеном** (супрессорным геном, рецессивным опухолевым геном, опухолевым супрессором) называется ген, который:

- а) в норме оказывает инактивирующее влияние на процессы пролиферации и (или) способствует клеточной гибели;
- б) инактивируется в опухолях;
- в) осуществляет реверсию злокачественного фенотипа в экспериментах по трансфекции.

К концу 1980-х годов было установлено, что практически каждая опухоль содержит множественные мутации в антионкогенах, выражающиеся как в виде делеций, так и в форме микромутаций.

Вероятно, инактивирующие повреждения супрессорных генов встречаются существенно чаще, чем активирующие мутации в онкогенах. В целом открытие антионкогенов стало заметным этапом в истории молекулярной онкологии, добавив целостности и логичности к имевшимся до этого воззрениям.



# Антионкогены

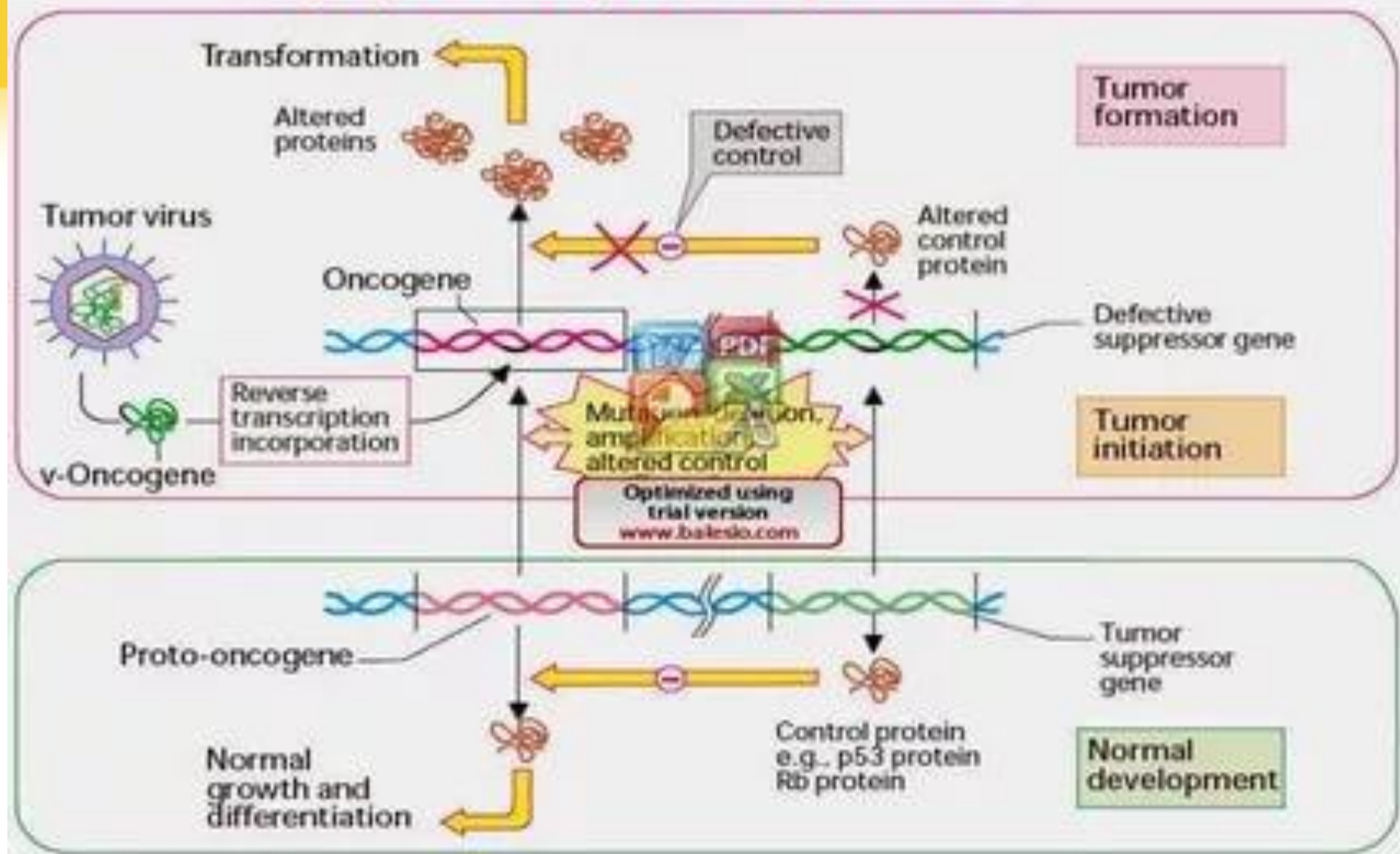
Наиболее известным супрессорным геном является ген *p53*. Он кодирует небольшой белок, осуществляющий огромное число разнообразных защитных функций. В частности, *p53* контролирует ответ клетки на повреждение ДНК посредством взаимодействия с другими регуляторными белками и инициирует процессы блокировки клеточного цикла, репарации ДНК, апоптоза. Помимо этого *p53* является фактором транскрипции, т.е. регулирует уровень экспрессии целого ряда генов.

Другой хорошо изученный супрессорный ген - *RB1* - участвует в контроле деления клеток.

К супрессорным генам с определенными оговорками можно отнести практически все гены, участвующие в поддержании геномной стабильности. Наследственные мутации во многих из них - *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2* - являются причиной так называемых семейных раковых синдромов.



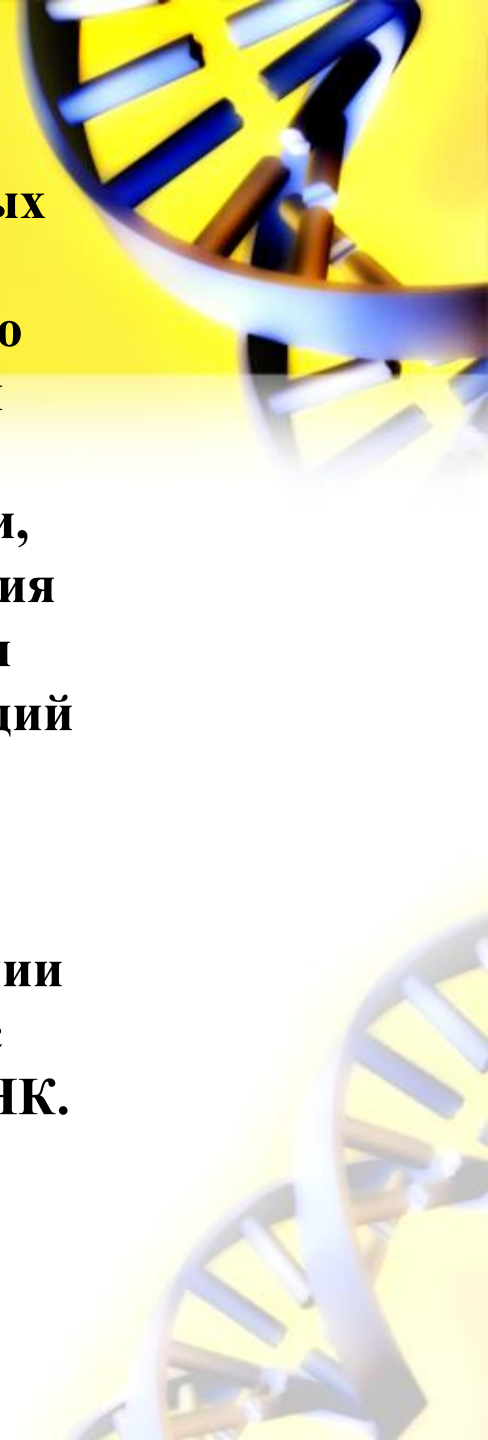
# Онкогены, протоонкогены и гены супрессоры опухоли



## Мутаторные гены

Наряду с этим выявлен ряд генов, специализированных на распознавании и восстановлении (репарации) повреждений ДНК, которые могут вызывать генетическую нестабильность и развитие рака. Такие гены получили название **мутаторные гены**. Они не индуцируют непосредственно злокачественную трансформацию клетки, но способствуют развитию опухоли, поскольку инактивация функции мутаторных генов настолько увеличивает темп и вероятность возникновения различных онкогенных мутаций и/или других генетических изменений, что образование опухоли становится лишь делом времени.

Физиологическая функция мутаторных генов заключается в выявлении повреждений ДНК и поддержании целостности генома путем активации репарационных систем с целью восстановления исходно-нормальной структуры ДНК. Поэтому их еще называют генами репарации ДНК.



## Мутаторные гены

Установлено, что инактивация подобных генов ведет к нарушению репарации ДНК, в клетке накапливается большое количество мутаций и резко увеличивается вероятность размножения клеточных вариантов с различными генетическими нарушениями.

В связи с этим в клетках с дефектными мутаторными генами возникает высокий уровень генетической нестабильности и соответственно повышается частота возникновения спонтанных или индуцированных генетических изменений (генных мутаций, хромосомных транслокаций и т.д.), на фоне которых и возникает рак.

Описаны наследственные формы новообразований, связанные с врожденными мутациями генов, продукты которых не обеспечивают функционирование систем репарации. Из этой группы наиболее изучены гены BRCA1 и BRCA2, MSH2, MSH6, MLH1, PMS2 и XPA, XPB и др.

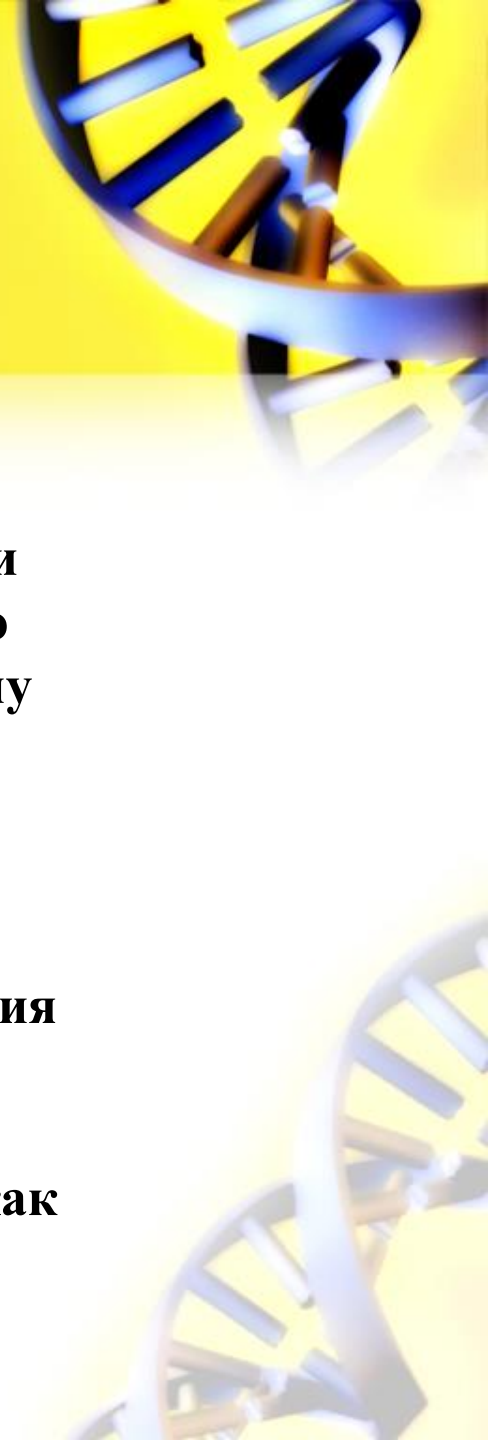


## Канцерогенез: микроРНК

Значимым событием первого десятилетия XXI века является открытие принципиально нового класса биологически активных молекул - **микроРНК**, которые представляют собой очень короткие некодирующие последовательности (около 20 нуклеотидов).

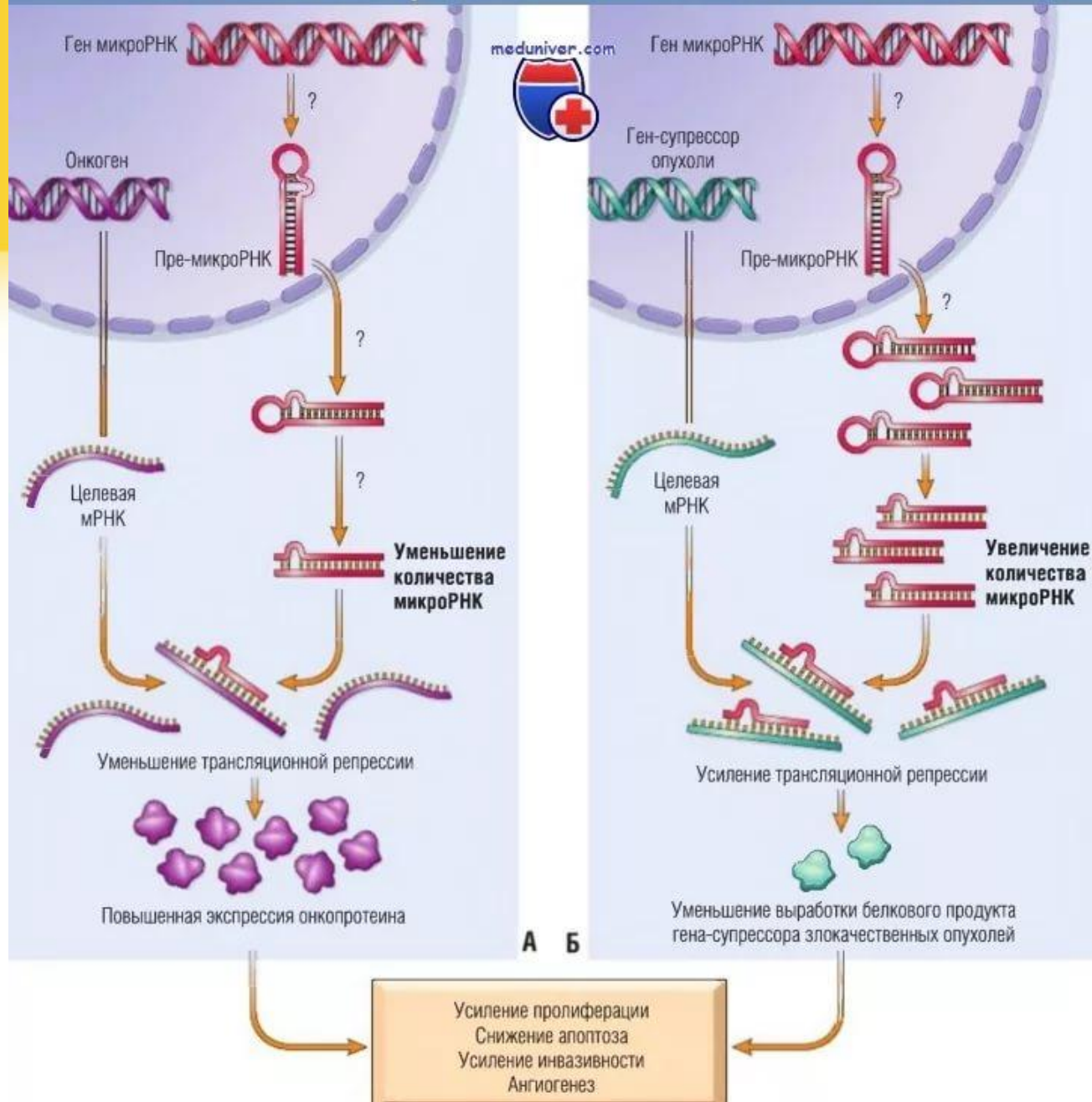
МикроРНК способны связываться с комплементарными участками кодирующих РНК, что приводит к угнетению трансляции и (или) деградациии последних. К настоящему моменту идентифицировано примерно 500 микроРНК. Каждая из этих молекул отвечает за функционирование десятков генов-мишеней.

Таким образом, микроРНК являются уникальным инструментом координации процессов функционирования генов. Многочисленные работы свидетельствуют о несомненной роли микроРНК в онкогенезе. Различные представители этого класса молекул могут выполнять как онкогенные, так и антионкогенные функции.





# Роль микроРНК в онкогенезе



# Канцерогенез

**Современная наука полагает, что для возникновения трансформированного клеточного клона необходимо как минимум 5-9 мутаций в разных онкогенах и антионкогенах; меньшее количество мутаций почти всегда компенсируется защитными системами организма.**

**Подобная особенность объясняет возрастное распределение онкологических заболеваний: большинство опухолей проявляют себя лишь во второй половине жизни, так как для их манифестации необходима целая цепь мутационных событий.**



# Mutations in Tumor Suppressor Genes

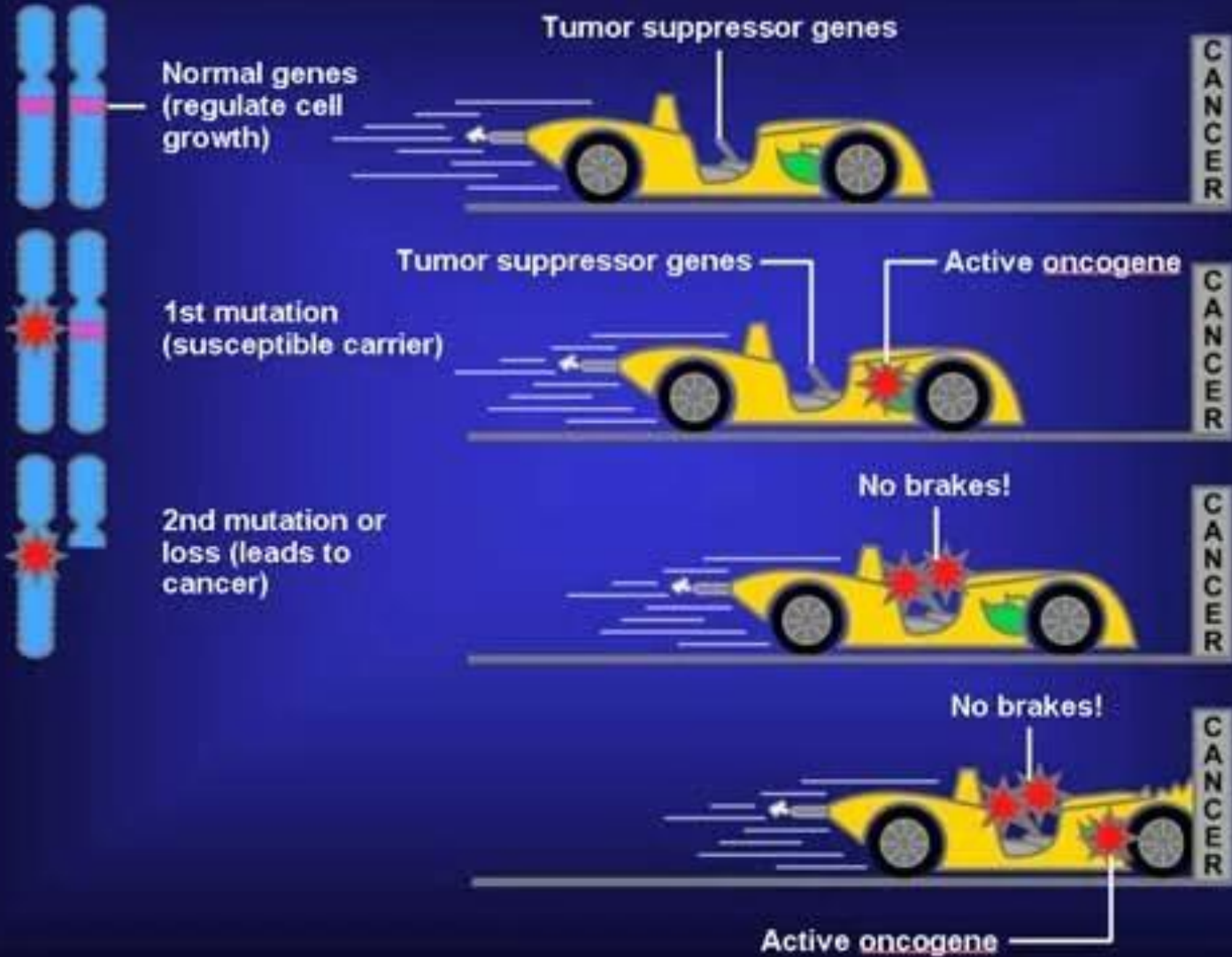
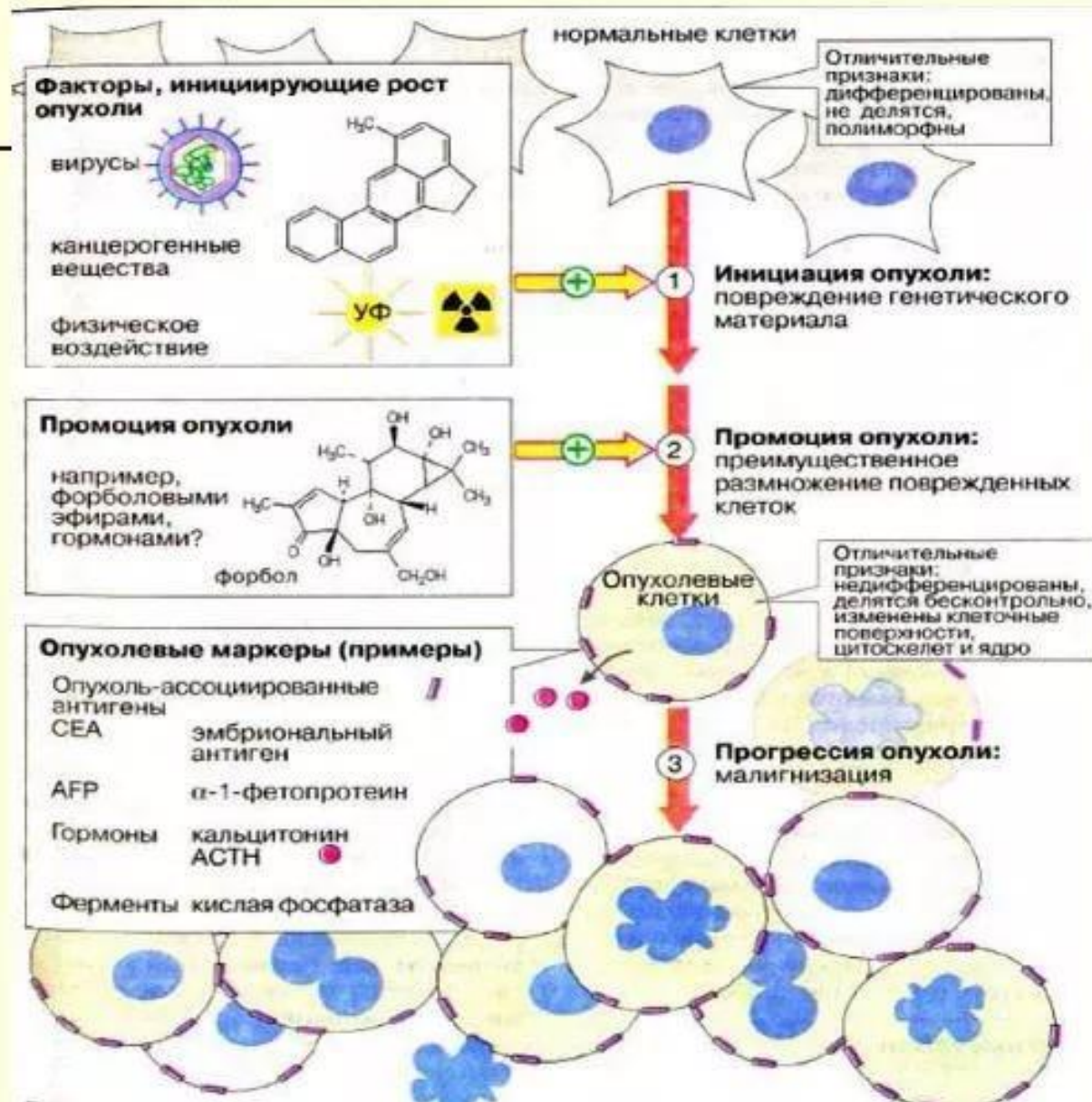


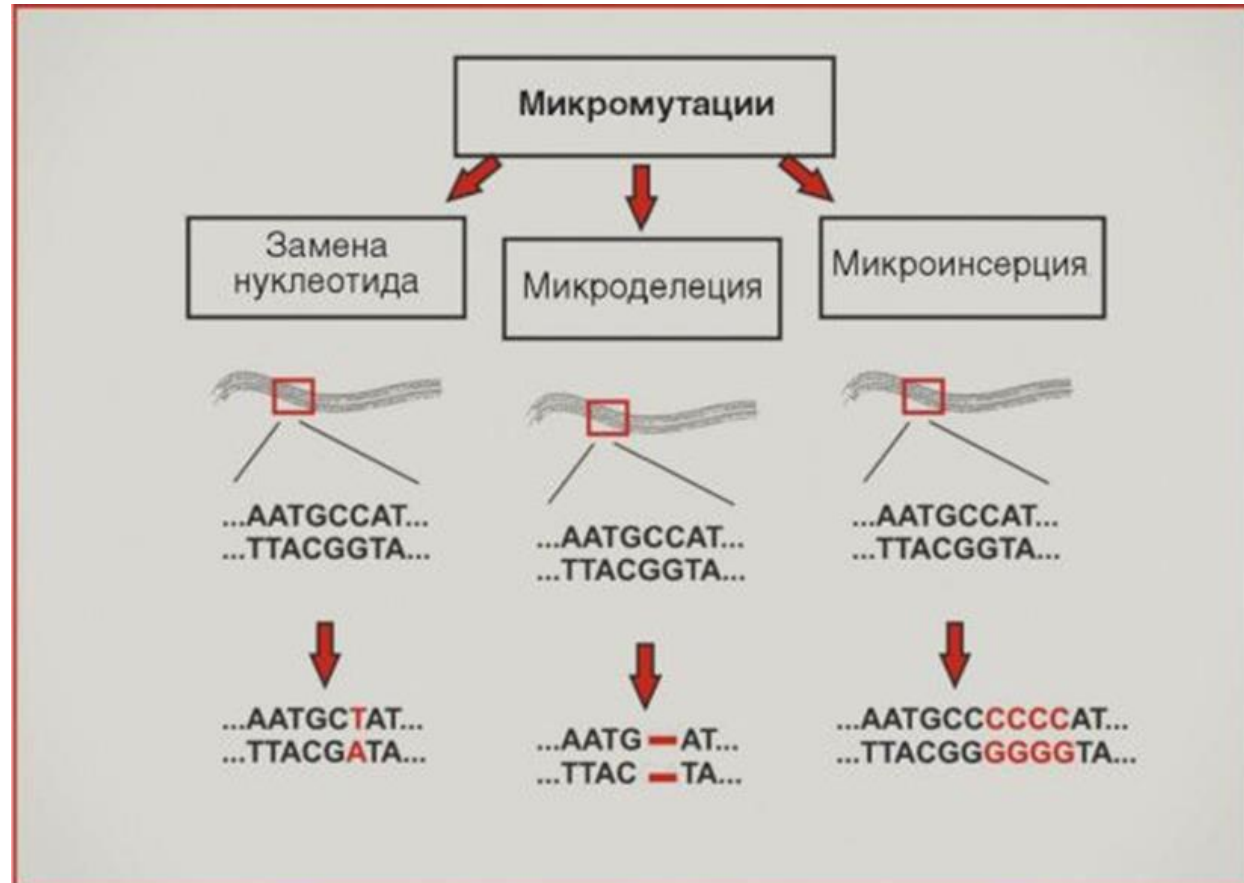
Illustration by American Society of Human Genetics

# Патогенез опухолевого процесса.



# Генетические нарушения в опухолях

Опухоли характеризуются широким спектром различных генетических нарушений. Многие онкогены и антионкогены поражаются посредством **микромутаций** - небольших изменений в последовательности ДНК, проявляющихся микроделециями, микроинсерциями или нуклеотидными заменами. Подобный тип нарушений лежит в основе активации онкогенов *RAS*, *BRAF*, *EGFR*, инактивации супрессорного гена *p53* и т.д.



# Генетические нарушения в опухолях

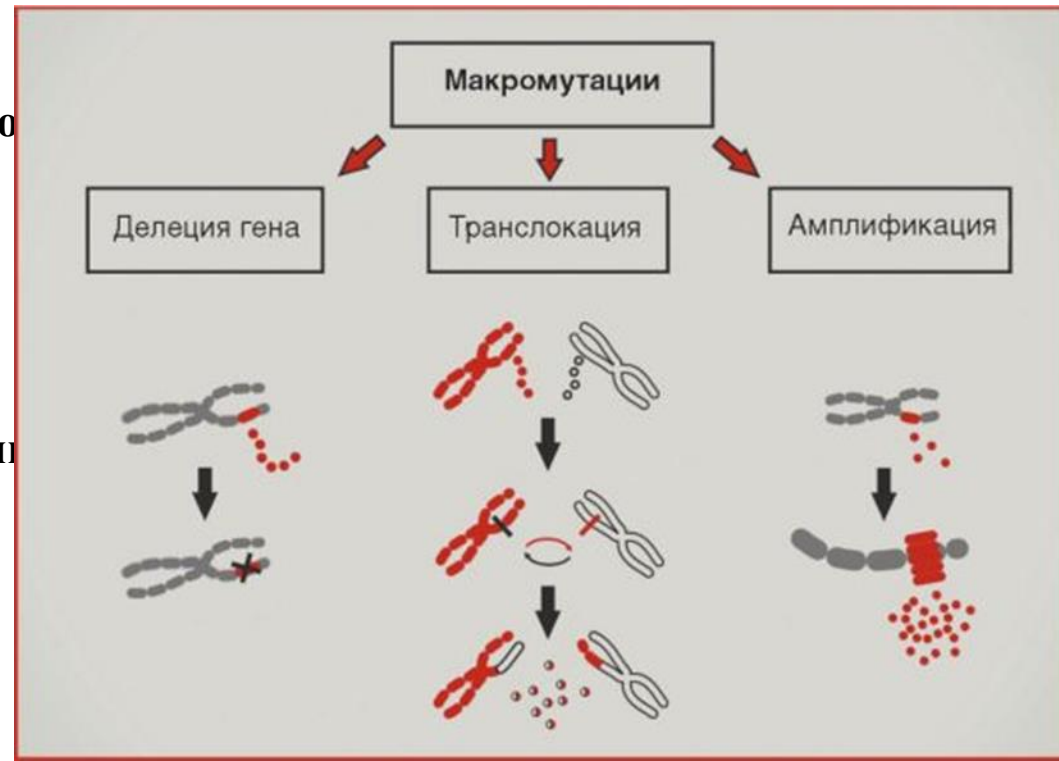


Большинство опухолей также характеризуется нестабильностью на уровне протяженных участков хромосом, поэтому для новообразований исключительно типичны нарушения копийности генетического материала.

Увеличение копийности онкогенов обозначается термином «**амплификация**», она приводит к возрастанию количества соответствующих белковых продуктов. Подобный механизм активации характерен для онкогенов *HER2*, *NMYC*, *cyclin D1*.

Значительно чаще амплификаций встречаются **делеции** участков хромосом; подобный механизм повреждений типичен для супрессорных генов *RB1*, *APC*, *p16*.

**Транслокации** - перестройки хромосом, приводящие к изменению уровня экспрессии генов или образованию химерных белков, - в большей степени характерны для онкогематологической патологии. Наиболее известна транслокация BCR-ABL, приводящая к образованию так называемой филадельфийской хромосомы и наблюдаемая при хроническом миелолейкозе.

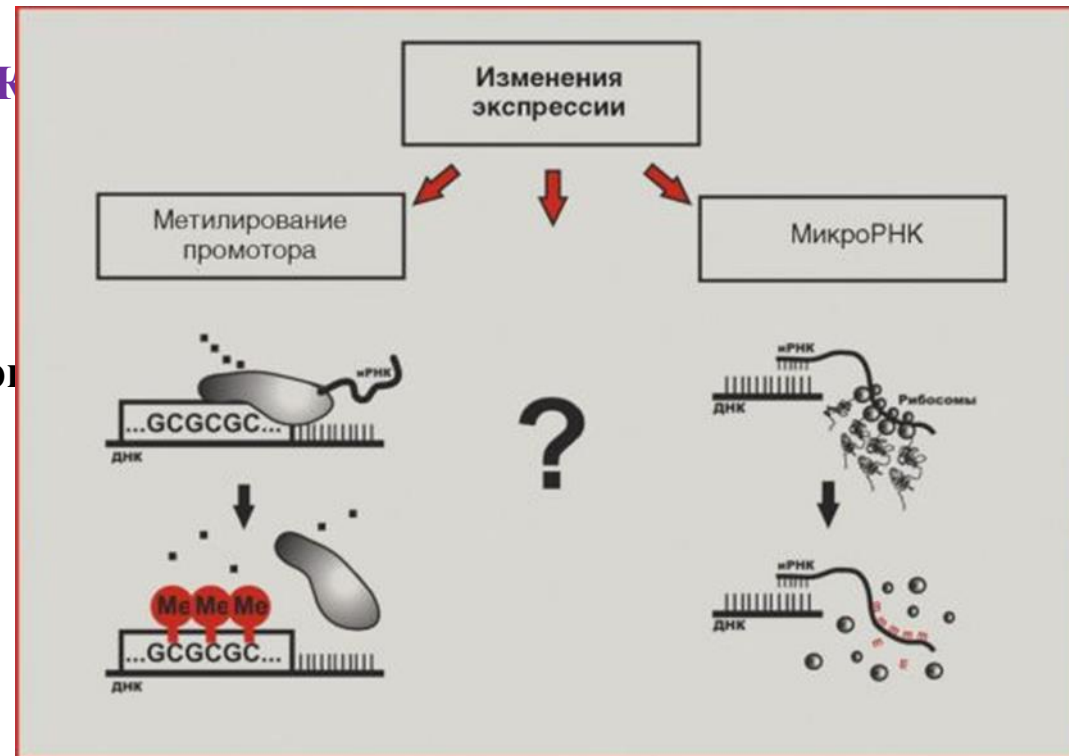


# Генетические нарушения в опухолях

В последние годы внимание исследователей все больше привлекают нарушения экспрессии генов в трансформированных клетках.

Изменения активности транскрипции онкогенов и генов-супрессоров обусловлены **метилованием** цитозинов в промоторных последовательностях. Статус метилирования по цитозину наследуется при делении клетки, поэтому метилированный цитозин иногда называют 5-м основанием ДНК.

Доказана существенная роль изменений экспрессии **микроРНК** формировании молекулярного портрета опухолевой клетки. Следует заметить, что многие аспекты механизмов регуляции экспрессии в норме и при патологии остаются неизученными.



# **Молекулярная диагностика онкологических заболеваний**

**На сегодняшний день доступного и единственного теста, позволяющего установить наличие злокачественной опухоли в организме человека, не существует.**

**Имеются лабораторные тесты, которые указывают на факт наличия опухоли в организме и позволяют контролировать динамику лечения.**

**Эти тесты основаны на выявлении опухолевых маркеров и дают возможность провести дифференциальную диагностику между доброкачественной и злокачественной опухолью, установить диагноз злокачественного новообразования, оценить распространенность опухолевого процесса, выявить рецидивы и метастазы опухоли, оценить эффективность методов специального лечения.**



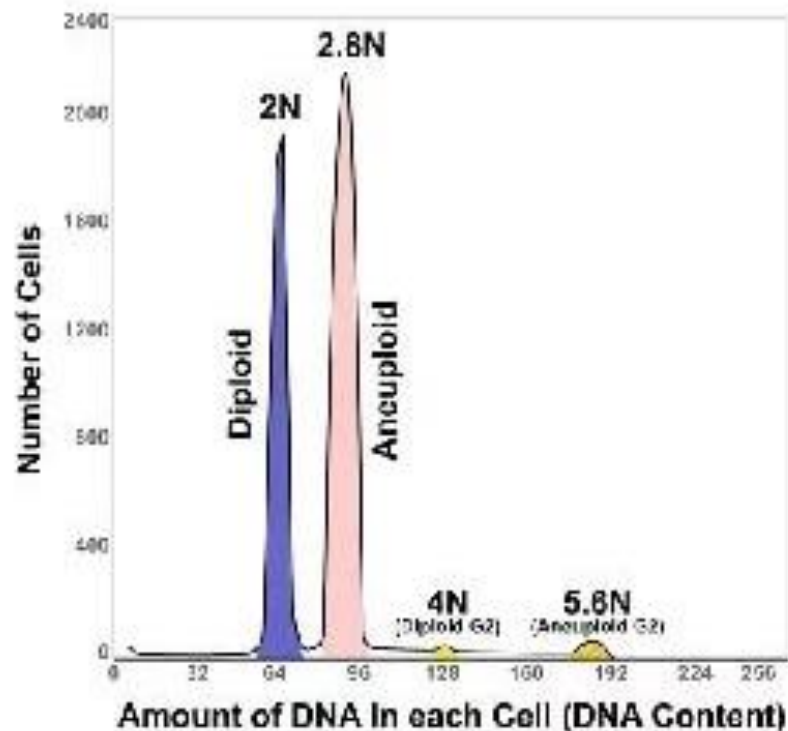


# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

На уровне молекулярной биологии в настоящее время производится **цитологическое исследование**, включающее метод **ДНК- проточной цитометрии**, при этом определяется злокачественность опухоли по числу клеток с диплоидным или анеуплоидным набором хромосом.

Анеуплоидный набор хромосом свидетельствует о высокой злокачественности процесса, диплоидный - о более высокой степени дифференцировки опухолей.

Количественная оценка и соотношение таких клеток в опухоли позволяет судить о степени злокачественности процесса.



Исследование ткани пищевода после биопсии – большое количество анеуплоидных клеток свидетельствует о высоком риске возникновения дисплазии или рака.

# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Второй метод диагностики онкологических заболеваний - выявление **онкомаркеров иммунохимическими** методами. Анализ многих иммунохимических маркеров выполняется с помощью стандартных диагностических наборов.

Биохимические онкомаркеры - большая группа факторов, обнаруживаемых в злокачественных и ассоциированных со злокачественным ростом клетках. Они включают:

- эмбриональные антигены;
- ростовые и дифференцировочные антигены;
- ферменты и изоферменты;
- другие факторы.

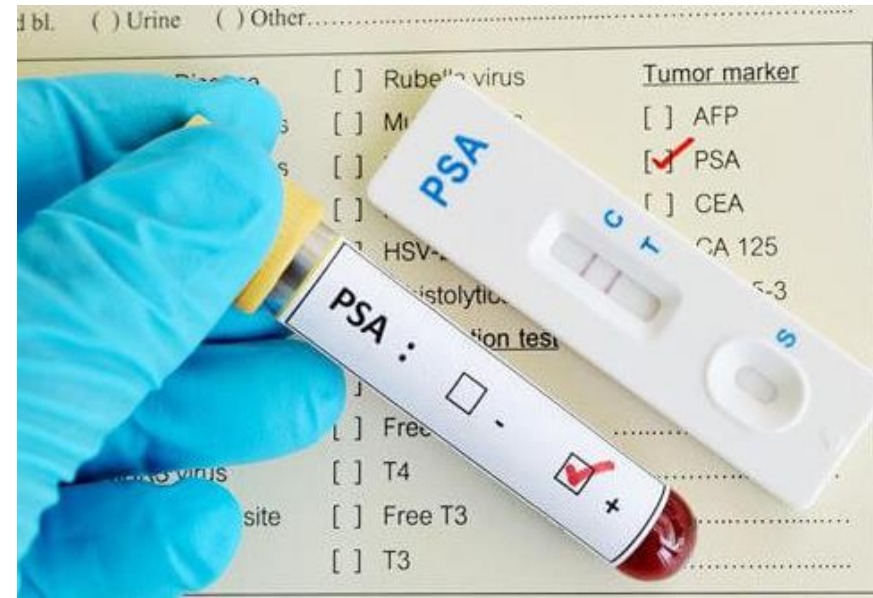


# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

**Опухолевыми маркерами (ОМ)** называют соединения (белки, биологически активные пептиды, гормоны, ферменты и метаболиты), которые синтезируются раковыми клетками либо клетками нормальных тканей в ответ на развитие рака. Они должны синтезироваться только в организме носителя опухоли и отсутствовать в нормальных клетках, т.к. являются продуктами аномальной экспрессии генома раковой клетки.

ОМ, как правило, обнаруживают в крови или других биологических жидкостях организма и используют:

- для скрининга населения на носительство опухоли;
- как прогностический фактор;
- для оценки состояния пациента в клинической стадии;
- для мониторинга в ходе лечения;
- в целях обнаружения рецидивов болезни.



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Согласно современной классификации, **опухолевые маркеры** делят на три основные группы:

- \* первичные опухолево-ассоциированные;
- \* вторичные, продуцируемые опухолью (специфические и неспецифические);
- \* вторичные, индуцируемые опухолевой болезнью.

Эта классификация не лишена недостатков, т.к. одно и то же соединение может синтезироваться клетками опухоли и вырабатываться нормальными клетками органа в ответ на опухолевую инвазию.

## Органоспецифические онкомаркеры



NSE



CA 125



CA 15-3



CEA

# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Идеальный опухолевый маркер должен удовлетворять следующим критериям:

- продуцироваться только злокачественными клетками;
- являться органоспецифичным;
- появляться в высоких концентрациях в биологических жидкостях;
- его концентрация должна коррелировать:
  - с размером опухоли;
  - со стадией заболевания;
  - с прогнозом;
  - с эффектом лечения;
- он должен позволять проводить диагностику всей опухолевой ткани.

Маркер, отвечающий всем перечисленным выше требованиям, до настоящего времени не обнаружен.



# **Молекулярная диагностика онкологических заболеваний**

**Значимость ОМ оценивают по следующим критериям:**

- 1) диагностическая чувствительность (характеризует способность теста выявить заболевание у больного);**
- 2) специфичность (характеризует способность теста давать отрицательный результат в группе здоровых);**
- 3) эффективность (характеризует способность различать опухолевые и неопухолевые заболевания).**

**Современные биохимические и иммунологические методы позволяют выявить неоплазму, когда число опухолевых клеток достигает  $10^9$ – $10^{10}$ , а уровень секретируемого опухолью маркера от 1 до нескольких фемтомолей ( $10^{-15}$  М) на 1 мл биологической жидкости.**

**Следует отметить, что большинство известных в настоящее время ОМ не отвечает этим критериям. Почти во всех случаях при ряде таких патологических состояний, как воспалительные заболевания печени, поджелудочной железы и легких, отмечается неспецифическое, часто незначительное повышение уровня маркера.**

# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

## Классификация онкомаркеров по их биологической функции:

1. Онкофетальные антигены (раково-эмбриональный антиген, альфа-фетопротеин, хорионический гонадотропин человека, СА 125, СА 15-3, СА 19-9).
2. Ферменты (кислая фосфатаза простаты, лактатдегидрогеназа, нейроспецифическая енолаза, специфический антиген простаты).
3. Гормоны (адренокортикотропный гормон, кальцитонин, паратгормон, пролактин).
4. Рецепторы (прогестероновые, эстрогеновые).
5. Другие соединения (ферритин, бета-2-микроглобулин, иммуноглобулины, тканевой специфический антиген).

# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

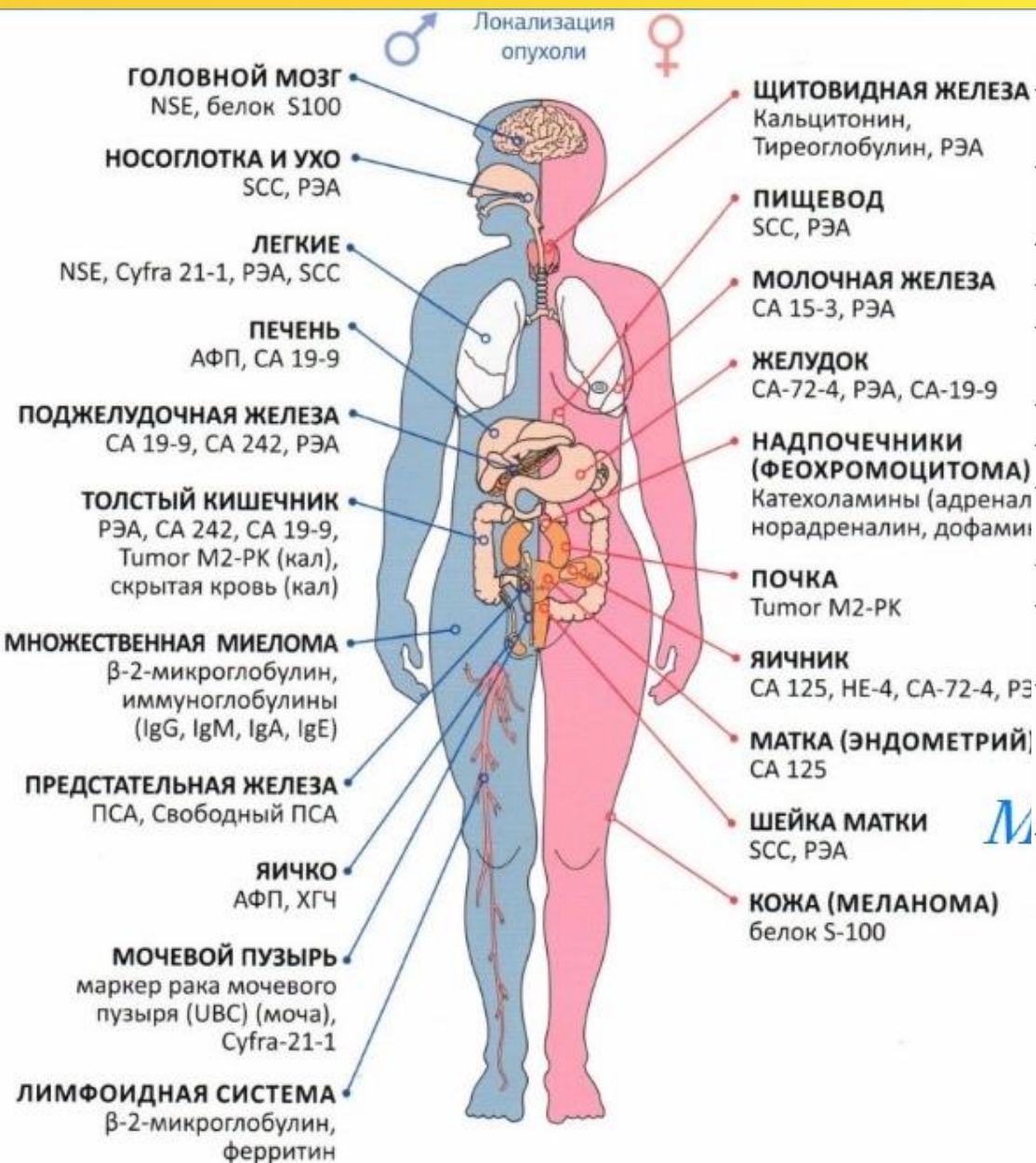
В клинической практике наиболее часто используют такие онкофетальные белки, как:

- раковый эмбриональный антиген (РЭА);
- $\alpha$ -фетопротеин (АФП);
- плацентарные белки (хорионический гонадотропин  $\beta$ -НСГ, плацентарная щелочная фосфатаза и др.);
- дифференцировочные антигены лимфоцитов (тканевый полипептидный специфический антиген или тканевый полипептидный антиген).

К онкомаркерам, появляющимся в организме больного в ответ на развитие опухолевого процесса, относят белки острой фазы воспаления, ферритин, церулоплазмин, гаптоглобулин, С-реактивный белок, изоформы ЛДГ и креатинкиназы и ряд других.



# Онкомаркеры и их нормальные значения



| Онкомаркер                                | Нормальные значения  |
|---|--|
| Раковоэмбриональный антиген (PЭA)         | До 3 нг/мл   |
| Альфафетопrotein (АФП)                    | До 15 нг/мл  |
| СА 19-9                                   | До 37 ед/мл  |
| СА 72-4                                   | До 4 ед/мл   |
| Муциноподобный раковый антиген (СА 15-3)  | До 28 ед/мл  |
| СА 125                                    | До 35 ед/мл  |
| SCC                                       | До 2,5 нг/мл   |
| Нейронспецифическая енолаза (HCE)         | До 12,5 нг/мл  |
| CYFRA 21-1                                | До 3,3 нг/мл   |
| Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) | 0-5 МЕ/мл (у мужчин и небеременных женщин)                             |
| Простатаспецифический антиген (PSA)       | До 2,5 нг/мл (мужчины до 40 лет)<br>До 4 нг/мл (мужчины старше 40 лет) |
| β-2-микροглобулин                         | 1,2–2,5 мг/л   |

# Диагностическая значимость онкомаркеров



| ВИД ОПУХОЛИ                              | Степень значимости маркера для конкретной опухоли |  |   |
|--|---|--|---|
|  | Высокая значимость                                | Средняя значимость                       | Низкая значимость                       |
| Рак толстой кишки (прямой кишки)         | РЭА / СА 242 / TuM2 (Кал)                         | СА-19-9 / СА-72-4                        |   |
| Рак поджелудочной железы                 | СА-19-9 / СА 242                                  | СА-72-4                                  |   |
| Рак желудка                              | СА-72-4   | РЭА / СА-19-9                            |   |
| Рак пищевода, гортани                    | SCCA  | РЭА                                      |   |
| Рак печени (печеночно-клеточный рак)     | АФП   |  |   |
| Рак желчных протоков                     | АФП / СА-19-9                                     |  |   |
| Рак молочной железы                      | СА-15-3   | РЭА                                      | СА-19-9 / СА-72-4, пролактин, эстрадиол |
| Рак яичников                             | индекс ROMA / СА-125 / HE4                        | АФП / СА-19-9 / СА-72-4                  |   |
| Рак шейки матки                          | SCCA  | РЭА                                      |   |
| Рак легкого                              |   | РЭА / NSE / Cyfra 21.1 / SCCA<br>СА-72-4 |   |
| Рак предстательной железы                | ПСА общ./своб. соотношение                        |  |   |
| Рак мочевого пузыря                      | UBS   |  | Cyfra 21.1                              |
| Рак щитовидной железы                    | кальцитонин / тиреоглобулин                       | РЭА, тиреотропный гормон                 |   |
| Опухоли носоглотки                       | SCCA  | РЭА                                      |   |
| Герминогенные опухоли яичка и яичника    | АФП / β-ХГ  |  |   |
| Хорионкарцинома                          | β-ХГ  |  |   |
| Меланома (кожа)                          | S100  |  |   |
| Нейроэндокринные опухоли (головной мозг) |   | NSE                                      |   |
| Рак эндометрия (матка)                   |   |  | СА-125 / РЭА / СА-72-4 / СА-19-9        |

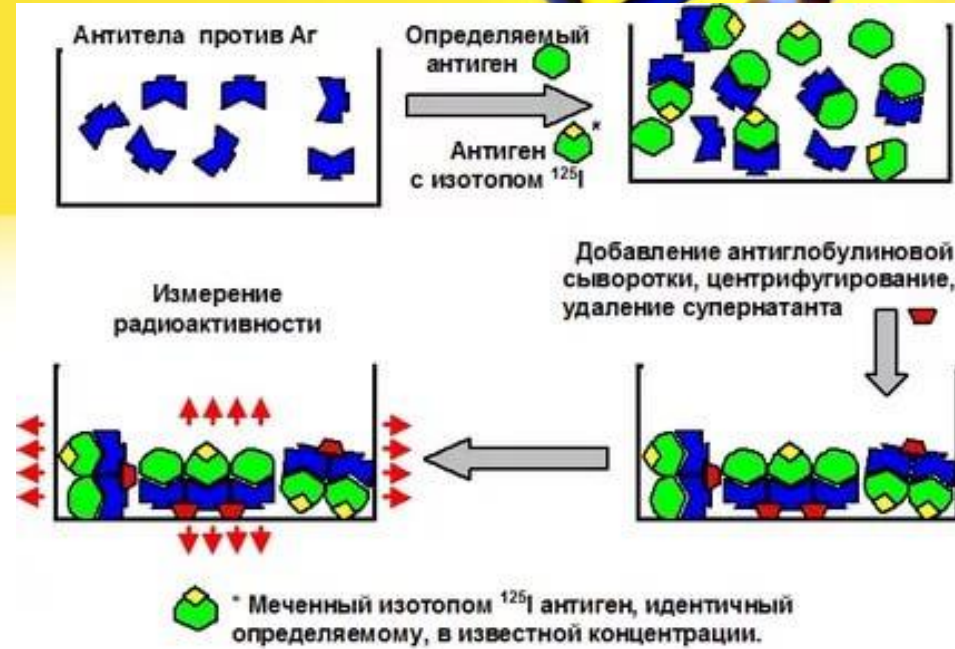
Результаты исследований интерпретируются с учетом клинической картины и данных инструментального обследования.



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний



**Основные методы определения уровня ОМ в сыворотке крови - радиоиммунологический, иммуноферментный, иммунохроматографический и хемилюминесцентный (с помощью специфических антител к этим белкам).**



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Дифференциальная диагностика опухолей человека с помощью **иммуногистохимии (иммуноцитохимии)** основывается на фундаментальных особенностях опухолевых клеток, которые сохраняются несмотря на опухолевое перерождение.

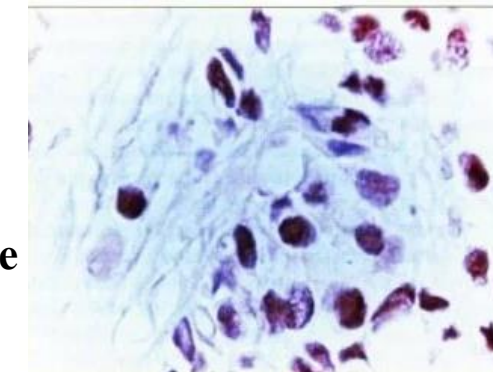
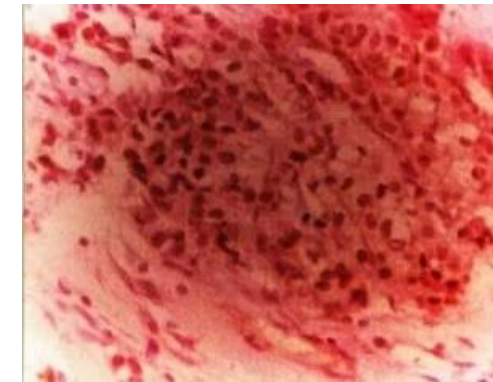
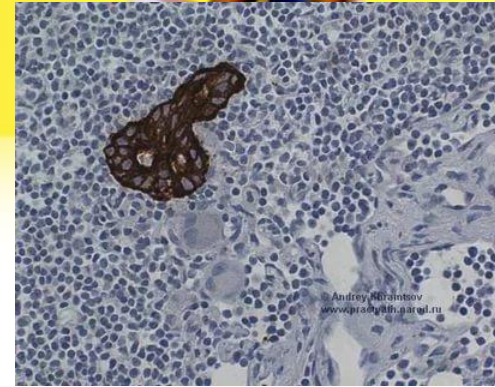
Эпителиальные, мышечные, сосудистые и другие опухоли имеют соответствующие наборы иммуногистохимических признаков, а также характерную ультраструктуру.

Иммуногистохимия сочетает в себе гистохимические и иммунологические методы исследования.

Этот способ обследования с использованием МКА позволяет изучить рецепторы опухолевых клеток, гормональный и ферментный состав клеточной цитоплазмы и оценить функциональные возможности клетки, состояние системы апоптоза. Особенно широко иммуногистохимические реакции применяют в онкогематологии.

Значительное число белков, выявляемых в опухолях иммуногистохимическими реакциями, кодируется отдельными функциональными генами, экспрессия которых подчиняется определенным правилам. Здесь используется широкий ряд МКА, выявляющих хорошо охарактеризованные клеточные антигены.

Таким образом, анализируется прижизненное местонахождение белков, экспрессируемых онкогенами, генами-супрессорами.

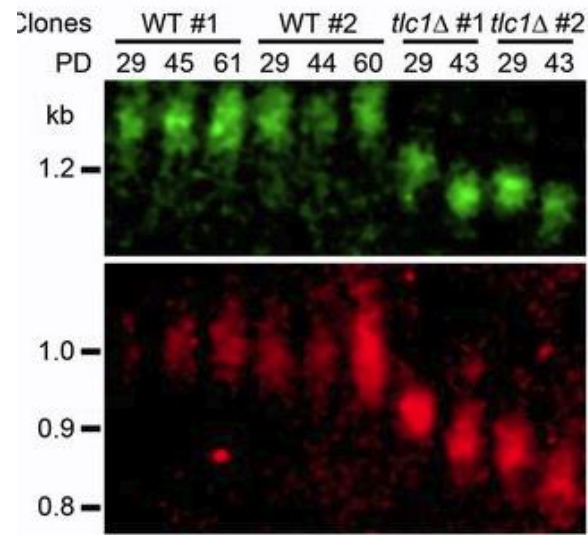


# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

**Флуоресцентная гибридизация *in situ*** позволяет обнаруживать хромосомные нарушения при помощи микроскопа. Специфический интересующий участок подвергают гибридизации с ДНК-зондами, которые распознаются селективными антителами, мечеными флюорохромом.

Гибридизация *in situ* используется и для обнаружения РНК и экспрессии генов. Исследование может быть выполнено на препаратах, фиксированных формалином и залитых в парафин.

Основное применение этого метода диагностики рака — типирование тканей, которые дают начало новообразованию. Особенно это позволяет обнаруживать гены, ответственные за развитие нейроэндокринных опухолей.



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

**Southern blotting** служит методом выявления в опухолевых клетках нарушений последовательности нуклеотидов в ДНК, особенно часто возникающих в ней при трансляции или амплификации. Чужеродная ДНК, например, вирусная, также может быть обнаружена этим методом диагностики рака.

Блоттинг можно применять и для выявления РНК (**Nothern blotting**) или протеинов – продуктов экспрессии онкогенов и ряда других генов, участвующих в канцерогенезе (**Western blotting**).



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

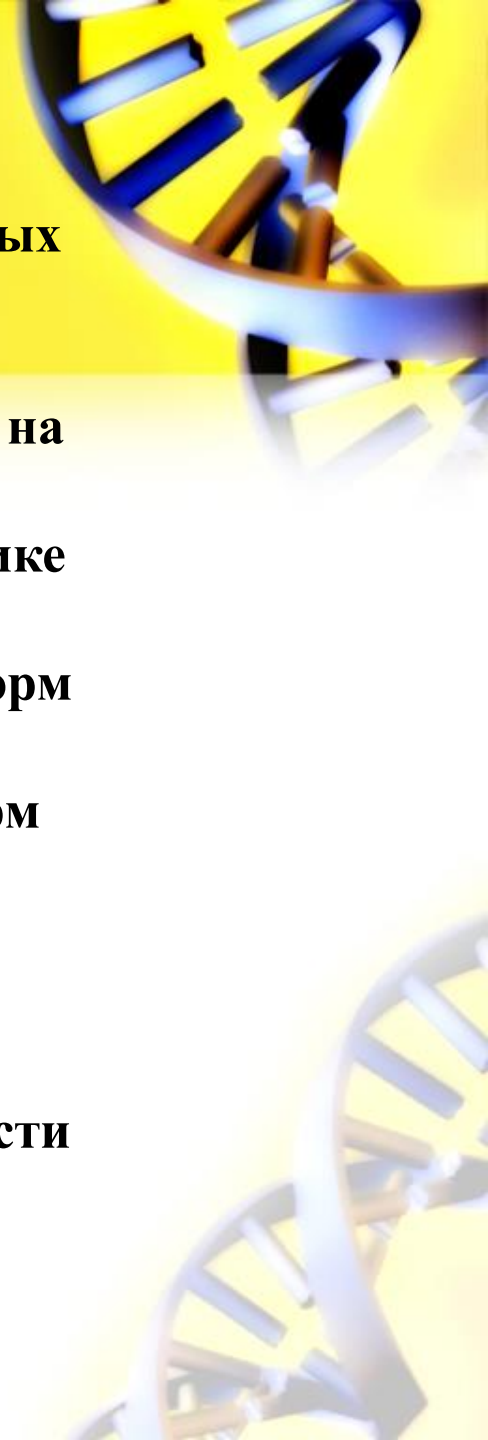
У здорового человека на протяжении всей жизни происходит не более двух мутаций. С момента первой поломки в здоровой клетке до момента ее превращения в злокачественное образование идет накопление тысяч мутаций в генах. Каждая мутация может быть генетической меткой опухоли. Метод **полимеразной цепной реакции** позволяет определять дефекты структуры ДНК протоонкогенов и антионкогенов, тестировать даже единичные последовательности ДНК онкологического гена, если он присутствует у пациента.

Достоинством ПЦР-анализа является высокая чувствительность, позволяющая определить  $10^{-15}$ - $10^{-18}$  г дефектной ДНК, что означает возможность выявления злокачественных клеток на доклинической стадии развития опухолевого процесса при выполнении одного лишь анализа. ПЦР-метод выявляет даже раковые образования, достигшие размером всего 2-3 мм.

# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Состояние данных о биологической роли тех или иных онкогенов и антионкогенов в предрасположенности к возникновению трансформированных клеток, формированию раковой клетки, ее прогрессии, реакции на терапию и, соответственно, прогноза терапевтического воздействия позволяют выделить в клинической практике следующие **направления ДНК-диагностики**:

1. Лабораторная ДНК-диагностика наследственных форм рака.
2. Лабораторная ДНК-диагностика спорадических форм рака с определением эффективных методов терапевтического воздействия и прогноза развития заболевания.
3. Лабораторная ДНК-диагностика микрометастазов.
4. Лабораторная ДНК-диагностика предрасположенности к возникновению рака.
5. Лабораторная диагностика функциональной активности генов.





# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Инновационные методы молекулярно-биологических исследований и широкое внедрение биоинформатических программ определяют новые направления молекулярного скрининга и тактику лечения онкологических больных.

В настоящее время на первый план в онкомолекулярной диагностике при определении химиотерапевтической лечебной тактики или прогнозировании течения опухолевого процесса выходят **микрочипирование** и методы **секвенирования нового поколения (NGS)**.

За прошедшее десятилетие был разработан целый ряд мультигенных молекулярных тестов, направленных на совершенствование диагностики и лечения онкологических заболеваний.



# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний

Для молекулярной диагностики в онкологии разработана технология денатурирующей высокоэффективной хроматографии (WAVE / DHPLC).

Основные преимущества технологии WAVE:

- экспресс-анализ (3 мин, более 400 образцов в день);
- контроль качества и количества наработанного продукта ПЦР;
- мультиплексная ПЦР;
- поиск любых неизвестных и/или известных мутаций, мутационный скрининг;
- SNP, инсерции, делеции;
- обнаружение от 1 % мутантной ДНК в общем пуле ДНК (поиск соматических мутаций);
- разделение и очистка фрагментов одноцепочечной ДНК;
- работа с РНК, в том числе анализ экспрессии генов и РНК-онкомаркеров.



Этап  
экстракции  
ДНК



Этап  
ПЦР



Этап  
детекции  
DHPLC



Этап  
секвениро  
вания

# Молекулярная диагностика онкологических заболеваний



Выделение  
(экстракция) ДНК



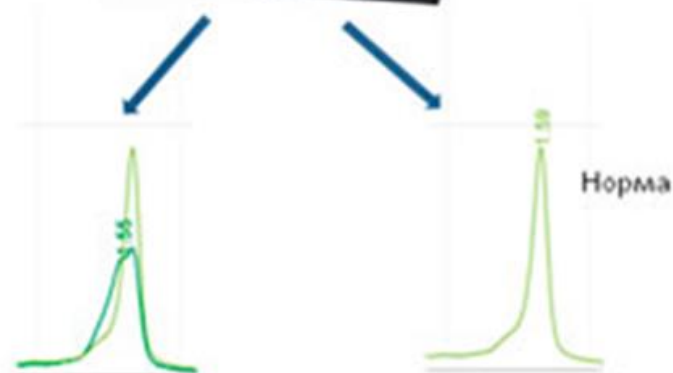
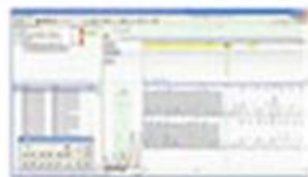
Аmplификация  
фрагмента ДНК



Анализ с помощью  
WAVE System



Отправить на  
секвенирование



Есть мутация  
(примерно 10%  
образцов)

Нет мутации  
(примерно 90%  
образцов)

Предварительный скрининг перед секвенированием

**Благодарю за  
внимание!**

