

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ОНКОЛОГИИ

Ч.Х. Валиахметова, А.А. Гарайшина, Д.Д. Сакаева

ГБУЗ Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Уфа

Валиахметова Чулпан Хусаеновна,
зав. поликлиникой №2 ГБУЗ РКОД МЗ РБ,
канд. мед. наук,
450054, Россия, Республика Башкортостан,
г. Уфа, Проспект Октября, д. 73/1,
тел. 8 (347) 232-94-57,
e-mail: chulpanV@mail.ru

Гарайшина Альбина Альфредовна,
биолог КДЛ поликлиники №2 ГБУЗ РКОД МЗ РБ,

Сакаева Дина Дамировна,
зам. гл. врача РКОД по лекарственной
терапии, д-р мед. наук

В статье проанализированы возможности практического применения наиболее изученных молекулярно-биологических маркеров в диагностике и лечении злокачественных опухолей. Изучены возможности применения генетических маркеров для превентивной диагностики наследственно обусловленных новообразований, для раннего выявления злокачественных опухолей, для подбора таргетной терапии, для мониторинга и прогнозирования течения заболевания. Предложен универсальный алгоритм исследования молекулярно-биологических маркеров. Рассмотрены возможности реализации внедрения молекулярно-биологических исследований в Республиканском клиническом онкологическом диспансере г. Уфы.

Ключевые слова: молекулярно-биологические маркеры, превентивная диагностика, таргетная терапия.

STUDY OF THE ROLE OF MOLECULAR BIOLOGICAL MARKER FOR CLINICAL APPLICATION IN ONCOLOGY

Ch.Kh. Valiakhmetova, A.A. Garaishina, D.D. Sakaeva

Clinical Oncology Dispensary, Ufa

This article analyzes the possibility of practical application of the most-studied molecular biological markers in the diagnosis and treatment of cancer. The possibilities of the use of genetic markers for the diagnosis of hereditary preventive caused tumors, for the early detection of cancer, targeted therapy for the selection, monitoring and prognosis of the disease. We proposed the universal algorithm for the study of molecular biological markers. The feasibility of the introduction of molecular biological research in laboratory of Clinical Oncology Dispensary of the Republic of Bashkortostan has examined.

Keywords: molecular biological markers, preventive diagnosis, targeted therapy.

Введение

В формировании общественного здоровья роль генетического фактора, по данным различных авторов, составляет от 20 до 40%. Генетическая предрасположенность является одним из важных факторов риска развития злокачественных новообразований. Поиск молекулярно-биологических причин возникновения и ранних маркеров злокачественных новообразований является наиболее изучаемой областью фундаментальной и прикладной онкологии [7].

Под влиянием неблагоприятных факторов – внешних и внутренних – происходит повреждение нормальных тканей организма на клеточном уровне. Нарастает число мутационных повреждений в генах, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла, происходит аномальная активация и выключение ответственных генов. Система регулировки жизненного цикла клетки (пролиферация, дифференцировка, морфогенетические реакции и апоптоз), становится неэффективной и приводит к стойкому повреждению геномного аппарата клетки. След-

ствием этого является то, что в клетках опухолевой ткани обнаруживается большое количество структурных перестроек, прежде всего транслокаций и делеций, количество которых нарастает по мере прогрессирования злокачественного роста [2,12,13].

Материалы и методы

Современные методы молекулярной биологии позволяют проводить комплексный анализ определенного типа опухоли и ДНК-диагностику для каждого конкретного пациента. Определенные молекулярные маркеры или их сочетание позволяют определить наследственную предрасположенность, гистогенез опухоли, чувствительность к современным химиопрепаратам, прогноз заболевания [1]. Биологическим материалом может служить перифе-

рическая кровь, пунктат опухоли, биоптат опухоли. На рис.1 схематично сформулирован алгоритм исследования маркеров для создания молекулярно-генетического портрета злокачественной опухоли.

На сегодняшний момент в рамках программы «Совершенствование молекулярно-генетической диагностики в Российской Федерации с целью повышения эффективности противоопухолевого лечения» предложено лаборатории ГБУЗ РКОД МЗ РБ проводить исследования для определения статуса мутации генов EGFR для больных раком легкого. Предложены методики, протоколы, наборы реагентов, обучающие программы и даже оборудование. Ещё несколько молекулярных тестов находятся на пороге к внедрению в нашей стране и уже внедрены в мировую онкологическую практику. Это позволи-



Рис. 1. Алгоритм исследования молекулярно-генетических маркеров

ло увеличить клиническую эффективность применяемой терапии, а также снизить себестоимость лечения за счет сознательного отказа от неэффективных вмешательств [11].

В проекте участвуют 9 лабораторий, которые проводят необходимые молекулярно-генетические исследования злокачественных новообразований. Среди них НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН (РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН) - лаборатория онкогеномики, ФГБУ "МНИОИ им. П.А. Герцена" Минздрава России - патологоанатомическое отделение, Московская городская онкологическая больница №62 (МГОБ№62) - лаборатория молекулярной биологии, НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова - отдел биологии опухолевого роста, Республиканский Клинический Онкологический Диспансер республики Татарстан - молекулярно-диагностическая лаборатория, ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» Краснодара – генетическая лаборатория, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (ИХБФМ СО РАН) - группа фармакогеномики, Учреждение Российской академии наук НИИ онкологии Сибирского отделения РАМН - лаборатория иммунологии с группой молекулярной онкологии г. Томска, Учреждение Российской академии наук НИИ онкологии Сибирского отделения РАМН, лаборатория патологической анатомии с группой иммуногистохимии. Лаборатория ГБУЗ Республиканского клинического онкологического диспансера Республики Башкортостан находится в тестовом режиме.

В лабораториях проводятся тесты на определение статуса мутации генов EGFR и KRAS для больных колоректальным раком и раком легкого.

Сегодня хорошо изученными являются мутации генов при немелкоклеточном раке легкого, раке молочной железы, меланоме, колоректальном раке.

EGFR (epidermal growth factor receptor) является продуктом одного из онкогенов семейства erb - c-erbB1, часто называемым по аналогии с названием кодируемого белка - геном EGFR. Известно, что при активации EGFR запускаются внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к повышению пролиферации малигнизированных клеток, росту опухоли, стимуляции процессов инвазии, патологического ангиогенеза и метастазирования. Определение мутаций гена EGFR у больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) является в настоящее время обязательной диагностической процедурой, клинически и экономически обоснованной. Проведение данного теста позволяет выделить группу пациентов, для которых наиболее вероятен выраженный клинический ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназы [15].

KRAS является геном, кодирующим один из белков, играющих важную роль в сигнальной системе рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) – сложного сигнального каскада, принимающего участие в развитии и прогрессировании рака. Белок KRAS регулирует другие белки, находящиеся далее в сигнальной системе EGFR, которые связаны с вы-

живаемостью опухоли, ангиогенезом, пролиферацией и метастазированием [15].

Обнаружение внутрихромосомной перестройки короткого плеча 2 хромосомы, ведущее к образованию химерного онкогена EML4-ALK при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) стало одним из важнейших шагов в дальнейшей расшифровке генома этого заболевания и расширении возможностей персонализации его лечения [12].

BRCA – ген, кодирующий фермент, участвующий в репаративных процессах в клетке и в регуляции клеточного цикла. Этот ген являлся первым, для которого было показано явное участие в этиологии семейных форм рака молочной железы [4].

BRAF – протоонкоген, представитель семейства белков RAS. Ключевой элемент пути RAS-RAF, обеспечивающий рост и существование клеток. Мутации в гене BRAF вызывают гиперактивацию этого сигнального пути, что может привести к чрезмерной пролиферации и злокачественной трансформации клеток. Мутации BRAF V600 обнаруживают примерно у половины больных меланомой и предположительно у приблизительно 8% пациентов с различными солидными опухолями [9].

Методики исследования генома опухолевых клеток

Спектр мутаций, выявляемых на сегодняшний день в геноме опухолевой клетки стандартными методами, ограничивается точечными заменами, делециями и инсерциями в участке ДНК. Разработано достаточно большое количество методов, позволяющих определять изменения в генах EGFR, KRAS, BRCA, BRAF, ALK с высокой точностью. Все они имеют как преимущества, так и недостатки, поэтому, выбирая метод для определения, необходимо ориентироваться на практические аспекты. Наиболее широко применяются методы полимеразной цепной реакции в различных вариантах и секвенирование [3,6,9].

Секвенирование и полимеразная цепная реакция позволяет найти, амплифицировать в исследуемом биологическом материале небольшой участок генетической информации (нуклеиновые кислоты) и идентифицировать их, определив положение нуклеотидов. Эффективность, простота исполнения, высокие показатели чувствительности и специфичности позволили ускорить процедуру анализа, сделав ее более надежной и воспроизводимой [5].

В ходе «Программы совершенствования молекулярно-биологической диагностики в РФ» предлагается возможность выявления ALK-транслокации методом FISH-тестирования как единственного метода, одобренного FDA, Международной ассоциацией по изучению рака легкого (IASLC) и Ассоциацией молекулярных патологов (США).

FISH (Fluorescence in situ hybridization) - цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК. Метод позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов.

Практическая значимость

Обследование пациента на наличие уже изученных генетических мутаций и поиск новых имеет огромное значение для разработки мер профилактики наследственно обусловленных злокачественных опухолей. Наиболее хорошо изученные и часто встречающиеся наследственно обусловленные мутации в генах представлены в таблице 1.

Таблица 1
Наследственно обусловленные злокачественные новообразования

Ген	Тип опухоли
RB1	Предрасположенность к ретинобластомам
CDKN2A/p16	Наследственные формы меланомы
BRCA1, BRCA2	Рак молочной железы, яичников, предстательной и поджелудочной желез
WT1	Нефробластома
RET	Семейная форма медуллярного рака щитовидной железы

Примером практического применения молекулярно-биологических методик для уточнения гистологического диагноза является определение специфических транслокаций методом FISH:

- При саркомах мягких тканей (саркома Юинга, синовиальная саркома, альвеолярная рабдомиосаркома, миксоидная липосаркома).
- При лимфопролиферативных заболеваниях (любые В-клеточные лимфомы, анапластическая Т-клеточная лимфома).
- Определение множественных хромосомных перестроек методом FISH для дифференциальной диагностики диспластического невуса и меланомы.

Молекулярный фенотип опухоли позволяет определить прогноз заболевания и тактику лечения. Генетический полиморфизм опухолей определяет индивидуальные различия в фармакодинамике и фармакокинетики лекарственных препаратов [6,14]. Для определения мутации и подбора таргетной терапии может быть рекомендована таблица 2.

Таблица 2
Таргетная терапия некоторых злокачественных опухолей

Заболевание	Маркер	Препарат (МНН)
Немелкоклеточный рак легкого	EGFR	гефитиниб, эрлотиниб
Немелкоклеточный рак легкого	ALK	кризотиниб
Колоректальный рак	KRAS и BRAF	цетуксимаб
Меланома	BRAF	вемурафениб
Меланома	c-kit	иматиниб, дазатиниб
ГИСТ	c-kit, PDGFRA	иматиниб
Рак молочной железы, рак желудка	c-erbB-2 Her2/neu	трастузумаб

Примером практического применения определения мутации в целях уточнения тактики ведения больного и подбора оптимальной химиотерапии может служить исследование на наличие мутации генов BRCA1 и BRCA2 при наследственном раке молочной железы и яичников. Обнаружение данной мутации диктует необходимость назначения неоадьювантной терапии препаратами платины.

Выводы

1. Востребованность молекулярной диагностики в практической онкологии представляется достаточно очевидной. Не вызывает никаких сомнений, что потребность в соответствующих тестах будет нарастать с каждым годом.

2. Молекулярно-генетический отдел при КДЛ ГБУЗ РКОД МЗ РБ имеет оснащение, позволяющее выполнять вышеперечисленные исследования методом ПЦР. Для внедрения технологий FISH и секвенирования необходимы люминисцентный микроскоп и секвенатор.

3. Внедрение в практику обследования пациентов на маркеры генетической патологии позволит конкретизировать и персонализировать меры профилактики злокачественных новообразований.

4. Внедрение молекулярно-биологических исследований позволит улучшить результаты диагностики и лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, подобрать адекватную лекарственную терапию, научно обосновать применение дорогостоящих лекарственных препаратов и, как следствие, получить положительный экономический эффект.

5. При соответствующем оснащении молекулярно-генетического отдела ГБУЗ РКОД МЗ РБ возможны поиск и открытие новых молекулярно-биологических маркеров опухолей, расширение спектра научно-исследовательской деятельности клиники.

Список литературы

1. Аляев Ю.Г., Курьинин Р.В., Пальцева Е.М., Михайленко Д.С., Залетаев Д.В. Молекулярные маркеры в диагностике и лечении рака почки // Мол. мед. – 2008. - №4. – С. 24-28.
2. Ганцев Ш.Х. Хуснутдинов Ш.М. Патология и морфологическая характеристика опухолевого роста: Учебное пособие. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2003. - 208 с.
3. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Стрельников В.В. и др. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов в процессах канцерогенеза // Мол. мед. – 2008. - №4. – С. 46-51.
4. Залетаев Д.В., Стрельников В.В., Немцова М.В. и др. Маркеры метилирования в диагностике онкологических заболеваний. Медицинская генетика. – 2010. - Т. 9. - №1. - С. 15-21.
5. Калмыкова М.С., Калмыков М.В., Белоусова Р. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции: Учебное пособие. - Спб.: Издательство «Лань», 2009. - 80 с.
6. Немцова М.В., Пальцева Е.М., Бабаян А.Ю. и др. Молекулярно-генетический анализ клональной внутриопухолевой гетерогенности в колоректаль-

ных карциномах // Мол. биол. – 2008. – Т. 42. – №6. – С. 1040-1047.

7. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний / Под ред. М.А. Пальцева и Д.В. Залетаева. - М.: ОАО Издательство «Медицина», 2009. - 384 с.: ил.

8. Alexander S. Tanas, Viktoria V. Shkarupov et al. Novel tools for unbiased DNA differential methylation screening // Epigenomics. – 2010. - Vol. 2. - №2. – P. 325-333.

9. Anglim P.P., Galler J.S., Koss M.N., et. Al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer // Mol Cancer. - 2008. - Vol.7. - P.62.

10. Belmar-Lopez C., Mancheno-Corvo P., Saornil M. A., et. al. Uveal vs. cutaneous melanoma. Origins and causes of the differences // Clin. Transl. Oncol. - 2008. - Vol.10. – P.137-142.

11. Blenkiron C., Miska E.A. miRNAs in cancer approaches, aetiology, diagnostics and therapy // Hum Mol Genet. - 2007. - Vol.16. - №1. - P.106-113.

12. Boikos S.A., Stratakis C.A. Molecular mechanism of medullary thyroid carcinoma current approaches in diagnosis and treatment // Histol Histopathol. - 2008. - Vol. 23(1). - P. 109-116.

13. Druker B.J. Perspectives on the development of imatinib and the future of cancer research // Nat Med. - 2009. - Vol. 15. - P. 1149-1152.

14. Klein G. Toward a genetics of cancer resistance // Proc Natl Acad Sci USA. -2009. - Vol. 106. - P. 859-863.

15. Maheswaran S., Sequist L.V., Nagrath S. et al. Detections in EGFR in circulating lung-cancer cells // New Engl J Med. - 2008. - Vol. 359. - P. 366-377.

16. Stephens P.J., McBride D.J., Lin M-L. et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes // Nature. - 2009. - Vol. 462. - P. 1005-1010.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИСХОДНОГО УРОВНЯ ПСА КРОВИ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Грицкевич, В.Л. Медведев, С.В. Мишугин, Н.А. Апольская, И.Г. Русаков

Клинический онкологический диспансер №1, г. Краснодар
Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского, г. Краснодар
Городская клиническая больница № 57, г. Москва
Городская поликлиника № 218, г. Москва

Грицкевич Александр Анатольевич,

врач-онколог 2 онкологического отделения Клинического онкологического отделения № 1, г. Краснодар, канд. мед. наук, 350040, Россия, г. Краснодар, ул. Димитрова, д. 146, тел. 8 (8612) 33-68-18, e-mail: grekaa@mail.ru

Медведев Владимир Леонидович,

зав. кафедрой урологии КубГМУ, г. Краснодар, руководитель Краевого уронефрологического центра Краевой клинической больницы № 1 им. проф. С.В. Очаповского, д-р мед. наук, профессор,

Мишугин Сергей Владимирович,

зав. отделением онкоурологии Городской клинической больницы №57, г. Москва, канд. мед. наук,

Апольская Надежда Александровна,

врач-онколог Городской поликлиники № 218, г. Москва,

Русаков Игорь Георгиевич,

зам. глав. врача по онкологии Городской клинической больницы №57, г. Москва, д-р мед. наук, профессор

В литературе, посвященной изучению факторов прогноза в лечении рака предстательной железы (РПЖ), значительное место отводится обсуждению роли уровня простатического специфического антигена (ПСА) до начала лечения. Несмотря на то, что многие вопросы о диагностической и прогностической ценности ПСА остаются нерешенными, а новые маркеры заболеваний предстательной железы внедряются с возрастающей частотой, мы предполагаем, что ПСА по-прежнему будет оставаться одним из основных методов скрининга и мониторинга больных РПЖ, ибо его высокая диагностическая ценность объясняется тканевой специфичностью.

Прогностическая ценность значительно возрастает при использовании исходного уровня ПСА и индекса Глисона. В данном материале приведены результаты ретроспективного анализа завершеного лечения 307 больных с РПЖ. Оценивалось влияние исходного уровня ПСА и уровня Глисона на выбор метода лечения, эффективность гормональной депривации и общую выживаемость.

Ключевые слова: простатический специфический антиген, показатель Глисона, рак предстательной железы.