

УДК 616-006.04-036-07:575.1

*О.В. Кайряк.\*, Т.В. Коростылева.\*\*, В.В. Комендант\**

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

*\*Донецкий областной противоопухолевый центр, Донецк, Украина**\*\*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия*

**Реферат.** В обзоре представлены данные о достижениях молекулярной медицины в диагностике, формировании групп риска по онкопатологии, определении факторов прогноза и минимальной остаточной болезни у больных злокачественными опухолями. Изложены данные о методике проведения полимеразной цепной реакции и ее основные модификации. Описана ступенчатая теория накопления мутаций в системах коррекции неспаренных оснований, SOS-системе, онкогенах и генах-онкосупрессорах в процессе канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Приведено понятие об эпигенетической регуляции активности генов и механизмах ее реализации-метиловании ДНК, РНК-интерференции, каталитической активности рибозимов. Обозначены перспективы индивидуального генного картирования и использования феномена РНК-интерференции для подавления активности онкогенов в качестве таргетной терапии. Показана необходимость оснащения крупных онкологических центров оборудованием для ПЦР-технологии.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, онкогены, онкосупрессоры, эпигенетика, метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты

Несмотря на бурное развитие онкологии в течение последних лет, подавляющее большинство больных обращается за онкологической помощью не на ранних стадиях развития болезни. Так, по данным Украинского канцер-регистра, заболеваемость раком на Украине за 2005г. составила 333,7 на 100 тысяч населения, из них обратившихся в 3-4 стадии заболевания – 34,8. По Донецкой области аналогичные данные выглядят следующим образом: 321,1 и 37,8.

Сложившаяся ситуация объяснима медицинскими и социально-экономическими причинами. Во первых, на ранних стадиях развития опухоли онкопатология относится к сложным для диагностики заболеваниям, так как клинически себя практически не проявляет и "рак не имеет специфического анамнеза либо протекает под маской других болезней". И только глубокая инвазия ткани, сдавление окружающих тканей, распад опухоли, кровотечение и появление болевого синдрома заставляет пациента обратиться к врачу. Увы, опухоль в таком случае диагностируется не в 1-2 стадии.

В последнее время растут и социально-экономические предпосылки запущенности опухолей. Если в 80-х годах основная масса населения формировала устойчивые коллективы крупных промышленных предприятий, то сейчас в связи с падением темпов роста производства (-0,3% за 1-й квартал по Украине), закрытием шахт и т.д. значительное количество населения не сформировано в крупные коллективы и не охвачено профилактическими осмотрами, диспансерным наблюдением. Не следует сбрасывать со счета и возросшее влияние на сознание наших граждан реклам средств массовой информации о нетрадиционных методах диагностики и лечения злокачественных опухолей, что также заставляет население за традиционной медицинской помощью тогда, когда нетрадиционные средства не помогли, когда уже слишком поздно.

Все вышесказанное диктует необходимость совершенствования организации ранней диагностики злокачественных опухолей путем охвата широких масс населения инструментальными методами исследования. Однако реальная оснащенность современными инструментально-диагностическими приборами больниц и поликлиник Украины оставляет желать лучшего, поэтому целесообразно обследовать в первую очередь лиц из групп риска по отдельным нозологическим единицам новообразований. Формирование групп риска может складываться на основе анкетирования, данных о предопухолевой патологии, представленных первичным звеном оказания медицинской помощи (участковые, цеховые врачи) и использования лабораторных методов исследования.

Другой важной проблемой современной клинической онкологии является определение минимальной остаточной болезни с целью максимальной индивидуализации тактики лечения конкретного пациента с учетом биологических характеристик индивидуальной опухоли [22].

Пристальное внимание как онкологов-клиницистов, так и исследователей в области экспериментальной онкологии привлекают результаты работ, использовавших полимеразную цепную реакцию в качестве одного из методов ранней диагностики, определения факторов прогноза и минимальной остаточной болезни у больных злокачественными новообразованиями.

Принципиально использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало возможным после

открытия К. Mullis в 1985г [31]. Использование термостабильной ДНК-полимеразы, выделенной из бактерий геотермальных источников *Thermus aquaticus*, живущих при более высоком температурном оптимуме (70-75С), чем теплокровные, собственные ферменты которых при данном диапазоне температур инактивированы, существенно расширило возможности ее применения. ПЦР позволяет в течение нескольких часов выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходное в  $10^8$  степени раз.

Реакция осуществляется следующим образом: к исследуемому образцу ДНК добавляются праймеры – короткие участки ДНК (20-30 нуклеотидов), ограничивающие начало и конец искомой последовательности. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними. Кроме праймеров, к пробе добавляется смесь нуклеотидов, из которых будут синтезироваться копии искомой последовательности и фермент – термостабильную ДНК-полимеразу. Смесь помещается в термоциклер –амплификатор, в котором в течение ряда циклов в геометрической прогрессии нарабатывается необходимое количество искомого фрагмента ДНК. Каждый цикл представляет собой ступенчатый процесс, протекающий при разных температурах: I – денатурация ДНК при 95С, II – посадка праймеров на комплементарные последовательности (40-60С), III – копирование искомой последовательности между праймерами с помощью ДНК – полимеразы при 70-75С [7].

Чувствительность данной методики превосходит все остальные методы, используемые в настоящее время для определения искомой специфичности. ПЦР позволяет выявить 1 лейкозную либо опухолевую клетку среди 100 000 нормальных [32]. Визуализация амплифицированного фрагмента ДНК осуществляется при окраске геля флюорохромами после проведения гель-электрофореза. Одной из последних методологических модификаций ПЦР является ее проведение в режиме реального времени (RT-PCR), когда исключается этап разделения и визуализации продуктов ПЦР в геле. Визуализация происходит непосредственно в реакционной смеси благодаря присоединению к праймерам флюорохромов. Введение в реакцию дополнительной ступени-синтеза ДНК на РНК-матрице ферментом обратной транскриптазой позволяет выявлять и РНК, например, РНК-содержащие вирусы или тканеспецифические РНК.

Началом клинического применения ПЦР в онкодиагностике можно считать работу E. S. Kawasaki, 1988, [28] показавшую возможность диагностики хронического миелолейкоза этим методом. В диагностике солидных опухолей ПЦР одним из первых была применена D. Smith с соавт, 1991 для обнаружения клеток меланомы в периферической крови [35].

Приоритетным в последние годы исследований в экспериментальной онкологии является изучение генов, вовлеченных в процесс канцерогенеза и принимающих участие в дальнейшей опухолевой прогрессии. Развитие солидных опухолей человека представляет собой длительный, многоступенчатый процесс [1].

Наиболее ранним событием канцерогенеза является развитие генетической нестабильности. В нормальной клетке сосуществуют две системы - механизм точного воспроизведения материнской молекулы (коррекция неправильно спаренных оснований - КНО) и SOS-система, поддерживающая видовую изменчивость на определенном уровне [15]. Возможно, у позвоночных одной из функций SOS-системы является участие в реаранжировке переменных частей генов иммуноглобулинов. Наиболее информативной мишенью определения генетической нестабильности генома являются микросателлиты – небольшие участки tandemно повторяющихся нуклеотидных последовательностей, содержащих от 2 до 6 нуклеотидов, так как именно в этих участках наиболее часто наблюдается сбой работы полимеразного комплекса. Проверка нестабильности структуры микросателлитов становится тестом на цельность или дефектность генетической системы коррекции неспаренных оснований [5].

Организм взрослого человека содержит от 50 до 100 триллионов клеток. По приблизительным оценкам, несколько миллиардов из них делятся ежедневно. К 40 годам до 100000 клеток человека могут подвергаться мутации из-за ошибок репликации при условии нормальной активности коррекционных систем клетки. Однако эти мутации не являются фатальными, если не затрагивают серию регуляторных генов клетки, включающую группы онкогенов, онкосупрессорных генов и генов репарационных систем клетки [38].

Случайный характер мутаций различных генов определяет индивидуальность каждой опухоли. В то же время отбор мутантных клеток на способность к неконтролируемому клеточному делению позволяет стать родоначальниками опухоли лишь тем клеткам, где мутации затронули ключевые гены процессов клеточного деления, программируемой клеточной гибели (апоптоза) или дифференцировки. Кроме того, по мере опухолевой прогрессии в опухолевых клетках накапливаются дальнейшие мутации, определяющие такие качества фенотипа, как инвазивный рост, способность к метастазированию [1].

Значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов канцерогенеза связан с доми-

нантно активируемых в опухолях онкогенов (протоонкогенов) и инактивированных по рецессивному типу (при повреждении обеих родительских аллелей) антионкогенов- генов-супрессоров опухолевого роста [34,38]. Протоонкогены оказались первыми генами, на которых было показано, что мутации в них являются одними из ключевых факторов канцерогенеза. Классический пример тому - онкоген *ras*, точечные мутации которого были обнаружены в клеточной линии, полученной из карциномы мочевого пузыря, а затем и в аденокарциномах кишечника, поджелудочной и щитовидной желез и легких. Другим классическим примером активации клеточных протоонкогенов является амплификация генов *neu* и *trk*. Различные варианты гена *trk* амплифицированы (многократно копированы) в мелкоклеточных карциномах легких, а также в других видах эпителиального рака, включая карциномы молочных желез, кишечника и шейки матки. Амплификация генов этой группы выявлена и в неэпителиальных неоплазиях, таких как промиелоцитарный лейкоз и глио- и нейробластомы. По-видимому, амплификация и соответствующее возрастание уровня экспрессии генов *trk* влияет на экспрессию генов, следующих в цепи каскада клеточной пролиферации. Амплификация онкогена *neu* (или HER-2) обнаружена в карциномах молочных желез, яичника и желудка. Ген *neu* кодирует рецептор эпидермального фактора роста.

Другие клеточные протоонкогены, такие как *c-abl* или *bcl-2* могут активироваться в результате различных транслокаций хромосом. Выявлены присущие этим транслокациям закономерности: ген, кодирующий Т-клеточный рецептор (TCR) или иммуноглобулин (Ig) переносится на участок, расположенный рядом с протоонкогеном, что приводит к повышенной экспрессии мРНК и белка этого протоонкогена, или хромосомные разрывы повреждают два специфических гена, что приводит к образованию слитого гена, кодирующего химерный белок с измененной функцией [13].

Вторая группа генов, которые играют принципиальную роль в канцерогенезе - это гены-супрессоры опухолевого роста. Список генов-супрессоров, к которым относятся хорошо известные гены *p53* и ретинобластомы *Rb105*, за последние годы существенно пополнился. Последнее десятилетие характеризуется открытием многих онкогенов и генов-супрессоров опухолевого роста. Согласно данным GenBank, известно более сотни потенциальных онкогенов (клеточных и вирусных), несколько десятков антионкогенов и более 300 потенциальных антионкогенов, расположенных на разных хромосомах человека. Эти гены связаны с регуляцией клеточного цикла, теломеразной системы, апоптоза, ангиогенеза и метастазирования.

Ген *p53*, получивший даже название "хранителя генома", является полифункциональным геном, участвующим во многих процессах, важных для нормального функционирования клеток. Основной функцией *p53*, непосредственно связанной с канцерогенезом и реализуемой при появлении различных нарушений в ДНК, является контроль клеточного цикла. *P-53* дуалистичен- сопрягает процесс регуляции пролиферации с поддержанием постоянства генома. *P-53* вовлечен в такие физиологические процессы, как развитие и дифференцировка, апоптоз, аррест клеточного цикла, геномная стабильность, резистентность к *H-1* парвовирусной инфекции [23]. В норме этот белок постоянно синтезируется клеткой и быстро деградирует. При наличии выраженных нарушений в структуре ДНК деградация прекращается и *p-53* начинает функционировать. Результатом этой активности является программируемая гибель клеток (апоптоз) с последующей элиминацией клеток с поврежденным геномом. Во многих опухолевых клетках эта функция гена *p53* нарушена и, как следствие, программа регулируемой гибели клеток переключается на программу фактически неограниченного долгожительства, характерного для опухолевых клеток [12,23,24,30].

Продукт второго, из наиболее хорошо изученных генов-супрессоров, гена ретинобластомы (*Rb1* – фосфопротеин), является регулятором экспрессии некоторых генов, контролирующих клеточный цикл. Активированный гипофосфорилированный *Rb1* связывает фактор транскрипции *E2F*, ингибируя его активность. Функцией *E2F* является активация генов, продукты которых необходимы для инициации и прохождения клеткой *S*-фазы клеточного цикла [2].

Молекулярно-генетические методы перспективны для формирования групп риска с целью раннего обнаружения опухоли, дифференциального диагноза с гиперплазиями, более точного определения типа опухоли, мониторинга опухолевого процесса при лечении, оценки степени злокачественности и развития множественной лекарственной устойчивости, а также в прогнозе заболевания. В этой связи можно выделить 5 основных направлений в практической молекулярной диагностике: 1 - диагностика наследственных форм рака; 2 – диагностика молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза; 3 – диагностика микрометастазов; 4 – диагностика маркеров, свидетельствующих о начальных стадиях опухолевого процесса; 5 – диагностика полиморфных ДНК –маркеров, увеличивающих риск развития определенного типа опухоли [9].

Материалом для анализа нуклеиновых кислот при солидных опухолях может быть сама опухолевая ткань, полученная при операции или биопсии, а также лимфатические узлы, содержащие опухолевые клетки [39]. Для выделения ДНК годятся даже срезы из парафиновых блоков или кусочки опухоли, хранящиеся в формалине или этаноле много лет [8]. Помимо самой опухоли, материалом

для выделения нуклеиновых кислот в зависимости от типа опухоли может быть слизь, мокрота, слюна, моча[37], фекалии[16], секреты желез, асцитическая жидкость и т. д. Обнаружение какого-либо маркера в опухолевом материале позволяет вести последующий мониторинг опухолевого процесса - оценивать наличие остаточных опухолевых клеток после операции или химиотерапии и за несколько месяцев предсказать появление метастазов и рецидивов опухоли, определяя этот же генетический маркер в ДНК плазмы крови.

Наиболее привлекательно использование молекулярно-генетических маркеров для формирования групп риска с целью ранней диагностики опухолевой болезни и мониторинга остаточной болезни. В этом случае универсальным источником ДНК опухолевого происхождения представляется плазма крови, которая является интегральным резервуаром организма, содержащим ДНК различного тканевого происхождения. Повышение содержания ДНК в плазме крови при развитии опухолей хорошо установлено. Еще в 1978 г. А.С. Белохвостовым с соавт. получены данные в пользу выхода ДНК клеток экспериментальных опухолей в кровотоки [3], а в 83г. D.Shapiro и соавт. [33] обнаружили повышение содержания ДНК в плазме крови при опухолях разного вида у человека. Анализ генетических нарушений в ДНК из плазмы крови является наиболее перспективным подходом для ранней диагностики онкологических заболеваний независимо от тканевой природы опухоли. Конечно, для ранней диагностики можно использовать и другие биологические образцы, которые в отличие от плазмы крови не столь универсальны. Так, например, выделения из влагалища или материал из зоны эрозии шейки матки пригодны для анализа молекулярно-генетических маркеров с целью раннего обнаружения опухолей шейки матки, моча - для ПЦР микросателлитных ДНК при диагностике рака мочевого пузыря. Наиболее достоверный диагностический результат может быть достигнут при сочетании анализа ДНК плазмы крови и тканеспецифических образцов. Стоит отметить, что даже при такой высокой чувствительности, которую дает ПЦР, диагностика остаточной болезни, рецидивов и метастазов осуществляется не в 100% случаев. С одной стороны, это связано с причинами чисто методологического характера (неспецифическая гибридизация, падение активности термостабильной ДНК-полимеразы, неоптимальное соотношение ингредиентов в реакционной смеси и т.д.). [21]. С другой стороны, к настоящему моменту времени исследователями не до конца осмыслен накопленный фактический материал, касающийся биологии опухолевой прогрессии, еще неидентифицированы гены, играющие ключевую роль в опухолевой прогрессии. Не исключено, что этими маркерами будут гены, задействованные в РНК-интерференции[27].

Одной из локализаций злокачественных опухолей, где уже сегодня широко применяются молекулярные технологии, является рак шейки матки. Доказано, что у 99% этой категории больных этиологическим фактором является вирус папилломы человека (ВПЧ) 16,18,31 и 45 типов. Наиболее часто (около 50%) встречается вирус 16 типа. Важную роль в патогенезе играют гены папилломавируса Е6 и Е7, продукты которых инактивируют гены-супрессоры опухолевого роста. Белковый продукт Е6 инактивирует и стимулирует деградацию Р-53, тогда как белок Е7инактивирует рRb [14].

В настоящее время метод ПЦР включён в скрининговую программу экономически развитых стран обязательного медицинского страхования. Доказано, что финансовые затраты на проведение эффективного скрининга ниже, чем на лечение больных с запущенными формами папилломовирусной инфекции.

Молекулярно-генетический скрининг вирусов папилломы человека имеет большое значение, так как ВПЧ- генотипирование позволяет дифференцировать папилломовирусы «низкого» и «высокого» риска у женщин с риском развития рака шейки матки.

Последующий алгоритм ранней диагностики и профилактики рака шейки матки выглядит следующим образом: При выявлении онкотропных папилломовирусов проводится цитологическая верификация изменений клеток эндоцервикса, при наличии которых показана расширенная кольпоскопия шейки матки.

При выявлении атипичного эпителия выполняется биопсия шейки матки с кюретажем цервикального канала. Отсутствие цитоморфологических изменений у больных-вирусоносителей диктует необходимость назначения противовирусного лечения. Данному контингенту больных проводят ПВЧ-тестирование, цитологическое и кольпоскопическое исследования 1 раз в 3 года.

У пациенток с фоновыми заболеваниями шейки матки при доказанных цитологических и молекулярных данных о наличии ВПЧ-инфекции 16-18-го генотипа необходимы деструкция этих патологических процессов методами крио- и лазеродействия с последующим цитологическим, эндоскопическим и лабораторным контролем (ДНК ВПЧ) на протяжении 6 мес. на фоне проведения системной противовирусной терапии [19].

Особый интерес исследователей в настоящее время прикован к проблеме эпигенетической регуляции активности генов. Термин "эпигенетический" определяется как наследуемое изменение в активности гена без изменения его нуклеотидной последовательности ДНК[36]. К этому разделу относятся работы, посвященные исследованию метилирования генов, ацетилирования гистонов и



РНК-интерференции. Эффект метилирования генов был открыт советским биохимиком Б.Ф. Ванюшиным. Уровень метилирования ДНК в различных тканях оказался различным [17], возникло предположение о сопряжении процессов метилирования и ограничения экспрессии различных генов в процессе тканевой дифференцировки в эмбриогенезе [4]. Авторами также было отмечено снижение уровня метилирования с возрастом. В последующем это предположение блестяще подтвердилось и сегодня лавинообразно растет количество работ, посвященных исследованию данного феномена. Критическими точками метилирования являются промоторные участки генов, особенно их островки, обогащенные гуанином и цитозином (CpG). Метилирование остатков цитозина небезразлично для структуры ДНК – оно стабилизирует двутяжевую спираль. Кроме того, метилирование цитозина может приводить к точечным мутациям. При последующей репликации метилированное основание цитозина заменяется аденином, что приводит к транзиции – замене нуклеотидных пар CG на AT. При онкопатологии метилирование является одним из механизмов активации протоонкогенов и подавления активности генов-супрессоров опухолевого роста [10]. Аномальное метилирование генов, ассоциированных с опухолевой болезнью, может быть использовано в качестве молекулярных маркеров формирования групп риска, индивидуального прогноза и мониторинга эффективности лечения [18]. Определение уровня метилирования генов, ассоциированных с опухолевым ростом методом ПЦР в перспективе является важным прикладным аспектом современной молекулярной биологии, так как индукция метилирования в ряде случаев является результатом РНК-интерференции.

Важность открытия эпигенетической регуляции активности генов состоит в том, что эпигенетика перебрасывает мост между организменным и клеточным уровнями регуляции живого.

Примером тому может служить изменение реакции клетки на гормоны, в частности, на кортикостероиды. Г.А. Романову удалось показать, что высокоочищенные дексаметазон-рецепторные комплексы из печени крысы специфично связываются с GC-обогащенными участками ДНК. Связывание рецептора стероида с ДНК является строго специфичным. Ждет своего объяснения и другой парадокс – несмотря на исключительную функциональную специфичность в физиологическом аспекте, рецепторы для андрогенов, глюкокортикоидов, прогестерона и минералокортикоидов могут узнавать одни и те же последовательности ДНК, отвечающие на действие гормонов [6]. Метилирование ядерной ДНК печени крысы ДНК-метилазой препятствует связыванию с ней гормон-рецепторных комплексов: ДНК становится невосприимчивой к действию гормонов. Дальнейшие исследования в данном направлении позволят путем определения индивидуальной карты метилирования участков ДНК, селективно связывающихся с рецепторами гормонов, индивидуализировать протоколы гормонотерапии в клинической онкологии.

РНК интерференция – один из важных посттранскрипционных механизмов регулирования активности генов. Это явление наблюдается у всех таксономических типов живого – бактерий, грибов, растений и животных. Эволюционно феномен РНК – интерференции сложился как защита от вирусной инфекции. Можно предположить, что в последующем этот процесс был использован эволюцией для реализации эффекта «замолкания» филогенетически древних генов, отработавших свою программу в онтогенезе. При опухолевой болезни наблюдается реактивация многих генов, работающих в норме в период эмбрионального развития, поэтому неудивителен все возрастающий интерес исследователей к проблеме РНК – интерференции при онкопатологии.

МикроРНК (miRNA) представляют собой отдельный класс коротких (21–22 п.н.) некодирующих функционально активных РНК. Данный тип регуляторных РНК был впервые выделен Lee et al., 1993 при изучении стадий эмбрионального развития *C. elegans* в 1993 году [29], обнаруженные короткие РНК, длиной приблизительно 22 нуклеотида (*lin-4*, *let-7*), контролировали сроки развития, связывая соответствующие целевые матричные РНК и предотвращая их использование в развивающейся клетке, предположительно за счет блокирования трансляции. Иначе эти молекулы называются рибозимами. Они обладают каталитическими функциями, в частности – способностью разрывать фосфодиэфирную связь в молекулах РНК-субстрата [26]. В последующем выявлены важные функции miRNA в координации клеточной пролиферации и смерти, в резистентности к стрессовым факторам, особенностям метаболизма. MiРНК кодируются собственными генами организма, MIR-генами, локализуясь, как правило, в иных областях, чем регулируемые ими гены, часто в виде кластеров. Как было обнаружено, последовательность их всегда содержит участки достаточно протяженных инвертированных повторов. MiРНК синтезируются с последовательности такого гена в виде длинного первичного транскрипта (первичного предшественника), который процессируется в более короткий (75–120 нт, у растений до 300 нт) предшественник (pre-miРНК) со шпилечной вторичной структурой и протяженным участком дцРНК. MiРНК в составе miРНК узнают мРНК гена-мишени в области обратной гомологии (обычно 3'-нетранслируемой области транскрипта) и разрезают ее приблизительно в середине образовавшегося дуплекса. Но, как известно, miРНК могут узнавать целевую мРНК и при неполной гомологии, область дуплекса в таком случае может содержать несколько (1–3) неспаренных нуклеотидов. В таком случае, неспаренные нуклеотиды могут препятствовать осуществлению рестрикции по механизму РНК-интер-

ференции, но miRNP остается связанным с мРНК-мишенью и блокирует ее трансляцию. При поиске факторов прогноза у онкологических больных нами выявлены одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот в лимфоцитах периферической крови лиц с благоприятным прогнозом [11]. В данной работе эти фрагменты расценены как маркеры апоптоза. Тем не менее, длинные одноцепочечные молекулы нуклеиновых кислот могут являться длинными первичными транскриптами miRНК. Такое предположение не противоречит литературным данным: miR-15a и miR-16 типов ингибируют активность антиапоптотического гена bcl-2, повышенная экспрессия которого зарегистрирована в опухолях различных локализаций [27]. Использование данного феномена в качестве новой стратегии лечения злокачественных новообразований обнадеживает. Конструкция *in vitro* miRNA к последовательностям протоонкогенов на сегодня является разработанной технологической проблемой. Трансфекция перевиваемых клеточных культур miRNA к с-тус снижает экспрессию последнего до 8% от первоначальной и полностью ингибирует пролиферацию злокачественных клеток [20]. Надеемся, что индивидуальное картирование экспрессии протоонкогенов, генов, задействованных в РНК-интерференции и назначение таргетной терапии, основанной на РНК - интерференции, позволит значительно улучшить результаты лечения онкологических больных.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков Н.М. Биологические и клиничко-морфологические аспекты учения о метастазировании злокачественных опухолей // Медицинский академический журнал.- 2003.-Т.3.-№1.-С.3-13.
2. Бабенко О.В., Землякова В.В., Немцова М.В., Саакян С.В. и др. Молекулярная патология при ретинобластоме // Молекулярная медицина.-2003.-№2.-С.48-54.
3. Белохвостов А.С., Лебедев С.Н., Шерлина С.С.//Радиобиология.-1987.-Т.27.-Вып.4.-С.505-509.
4. Ванюшин Б.Ф. Метилирование ДНК и ее биологическое значение //Успехи современной биологии.-1968.-Т.65.-№2.-С.163-185.
5. Вострюхина О.А., Никифорова И.Ф., Штам Т.А. и др. Повреждение гена рецептора типа II трансформирующего фактора роста TGF и микросателлитная нестабильность генома в клетках карцином желудка-кишечного тракта // Вопросы Онкологии.- 1998.-т.44.-№6.-С.667-671.
6. Дегтярь В.Г., Кушлинский Н.Е. Механизм действия андрогенов: специфические свойства //Молекулярная медицина.-2005.-№2.-С.9-16.
7. Дубинина И.Г., Щербо С.Н., Макаров В.Б. Метод полимеразной цепной реакции в лабораторной практике.//Клиническая лабораторная диагностика.-1997.-№7.-С.4-6.
8. Ельчева И.А., Гаспарьян А.В., Карселадзе А.И. и др. Молекулярно-генетические нарушения в области локализации гена BRCA1, ассоциированные с карциномами яичников // Молекулярная биология.-1998.-Т.32.-№2.-С.277-284.
9. Залетаев Д.В. Системы молекулярных маркеров в ДНК – диагностике онкозаболеваний // Молекулярная медицина.-2005.-№1.-С.10-17.
10. Залетаев Д.В., Немцова М.В., Бочков Н.П. Метилирование ДНК как этиологический фактор канцерогенеза //Вестник РАМН.-2002.-№4.-С.-11.
11. Кайряк О.В., Коростылева Т.В. Прогноз эффективности химиотерапии больных злокачественными опухолями путем детекции апоптоза в лимфоцитах периферической крови //
12. Кашкин К.Н., Николаев А.В., Турбин Д.А., Перевощиков А.Г. Делеции локусов YNZ22 и ALU-VPA/MYCL1 в аденокарциномах толстой кишки человека и послеоперационный прогноз // Молекулярная биология.-2001.-Т.35.-№5.-С.798-804.
13. Киселев Ф.Л. Гены стабилизации ДНК и канцерогенез // Молекулярная биология.-1998.-Т.32.-№2.-С.197-205.
14. Киселев В.И., Северин Е.С., Пальцев М.А. Противоопухолевые вакцины, белки теплового шока как индукторы противоопухолевого иммунитета// Молекулярная медицина.-2005.- №1.-С.3-10.
15. Ланцов В.А. Репарация ДНК и канцерогенез: универсальные механизмы репарации у про- и эукариот и последствия их повреждения у человека// Молекулярная биология.-1998.- Т.32.-№5.-С.757-772.
16. Ланцов В.А., Вострюхина О.А. Диагностика злокачественных опухолей толстой кишки с помощью молекулярно-генетического анализа фекальной ДНК // Вопросы онкологии.- 2005.- Т.51.-№2.-С.167-172.
17. Мазин А.Л., Ванюшин Б.Ф., Коротаев Г.К. Тканевая специфичность первичной структуры ДНК у животных // Доклады академии наук СССР.-1969.-Т.186.-№6.-С.1434-1436.
18. Немцова М.В., Землякова В.В., Жевлова А.И., и др. Профиль метилирования генов-супрессоров опухолевого роста при различных формах рака // Вестник института молекулярной медицины ММА им. Сеченова.-2002.-№2.-С.65-84.
19. Трушина О.И., Новикова Е.Г. Роль папилломовирусной инфекции в генезе рака шейки матки // Российский онкологический журнал.-2005.- №1.-С.45-51.

20. Черноловская Е.Л., Кабилова Т.О., Владимирова А.В., Власов В.В. Ингибирование пролиферации раковых клеток человека с помощью siРНК // Российский онкологический сервер webmaster@rosoncoweб.ru
21. Четверин А.Б., Четверина Е.В. Преодоление проблем ПЦР- диагностики с помощью метода молекулярных колоний // Молекулярная медицина .-2003.-№2.-С.30-47.
22. Чехун В.Ф. Функциональный онкоген – основа современной диагностики и новой стратегии противоопухолевой терапии //Онкология.-2006.-Т.8.-№2.-С. 96-101.
23. Alex Sigal and Varda Rotter Oncogenic Mutation of the p-53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome // Cancer Research.-2000.-Vol 60.-P.6788-6793.
24. Backus H.H.J., van Riel J.M.G., van Groeningen C.J. et al. Rb, mcl-1 and p53 expression correlate with clinical outcome in patients with liver metastases from colorectal cancer // Annals of oncology.-2001.-№12.-P.779-785.
25. Bishop J.M. Molecular themes in oncogenesis //Cell.-1991.-Vol. 64.-P.235-248.
26. Cech T.R. The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes // Sciens.-1987.-№4808.-P. 1532-1539.
27. Esquela-Kerscher A., Slack F.G. Oncomirs – micro-RNAs with a role in cancer //Nature Reviews Cancer.-2006.-Vol.6.-P.259-269.
28. Kawasaki E.S., Clark S.S., Coyne et al. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific m-RNA sequences amplified in vitro // Proc. Natl. Acad.Sci. (USA).- 1988.-Vol.85.-P.5698-5702.
29. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C. elegans germline gene lin4 encodes small RNAs with antisense complementary to lin-14 // Cell.- 1993.-75.-P.843-854.
30. Linderholm B.K., Lindahl T., Holmberg L. et al. The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlates with Mutant p-53 and Poor Prognosis in Human Breast Cancer // Cancer Research.-2001.-Vol.61.-P.2256-2260.
31. Mullis K.B., Faloona F.A., Scharf S. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.-1986.-51.-P.263-273.
32. Negrin R.S., Blume K.G. The use of polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease // Blood.-1991.-№2.-P.255-258.
33. Shapiro B., Chakralorti M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of circulation DNA level in patients with benign or malignant gastrointestinal diseases // Cancer.-1983.-Vol.44.-P. 2116-2120.
34. Sherr C.J. Principles of tumor suppression //Cell.-2004.-Vol.116.-№2.-P.235-246.
35. Smith B., Selby P., Southgate J. et. al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction // Lancet. – 1991.- Vol. 338. - P. 1227 – 1229.
36. Suzuki T., Miyata N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. : Curr Med Chem.- 2006.-№8.-P.935-958.
37. Utting M., Werner W., Muller G. et al. A possible noninvasive method for the detection of bladder cancer in patients: microsatellite analysis of free DNA in urine and blood // Ann N Y Acad Sci.- 2001.-Vol 945.-P.31-35.
38. Vogelstein B., Kinzler K.W. Cancer genes and the pathways they control // Nature Medicine.-2004.-Vol.10.-P.789-799.
39. Yamaguchi K., Kazuo Ch., Torato N. et al. Ki-ras codon 12 Point and P-53 Mutations: A Molecular Examination of the Main Tumor, Liver, Portal Vein, Peripheral Arterial Blood and Para-Aortic Lymph Node in Pancreatic Cancer // The American Journal of Gastroenterology.-2000.-Vol 95.-№8.-P.1939-1945.

*О.В. Кайряк., Т.В. Коростильова.\*, В.В. Комендант*

### **МОЛЕКУЛЯРНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ОНКОЛОГІЇ – КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ: ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ**

*Донецький обласний протипухлинний центр, Донецьк, Україна  
\*Інститут загальної генетики ім. М.І. Вавилова Російської академії наук, Москва, Росія*

В огляді наведені дані про досягнення молекулярної медицини у діагностиці, формуванні груп ризику з онкопатології, визначення факторів прогнозу та мінімальної залишкової хвороби у хворих на злоякісні пухлини. Викладені дані про методику проведення полімеразної ланцюгової реакції та її основні модифікації. Описана ступінчаста теорія накопичення мутацій в системах корекції неспарених основ, онкогенах та генах-онкосупресорах у процесі канцерогенезу та пухлинної прогресії. Наведено поняття про епігенетичну регуляцію активності генів та механізмів її реалізації – метилюванні дезоксирибонуклеїнової кислоти, каталітичної активності рибозимів. Означені перспективи індивідуального генного картування та використання феномена інтерференції рибонуклеїнової кислоти для

пригнічення активності онкогенів як таргетної терапії. Показана необхідність оснащення сучасних онкологічних центрів обладнанням для проведення полімеразної ланцюгової реакції.

**Ключові слова:** полімеразна ланцюгова реакція, онкогени, онкосупресори, епігенетика, метилювання дезоксирибонуклеїнової кислоти.

*O.V. Kairiyak, T.V. Korosteliova\*, V.V. Komendant*

### **MOLECULAR TECHNOLOGIES IN ONCOLOGY - CLINICAL PRACTICE: ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS**

*The regional Donetsk's anticancer center, Donetsk, Ukraine*

*\* Institute of the common genetics him. N.I.Vavilov of an Russian academy of sciences, Moscow, Russia*

In the review the data on achievements of molecular medicine in diagnostics, formation of groups of risk on cancerogenesis, definition of factors of the forecast and the minimal residual disease at patients with malignant tumours are submitted. The data on a technique of carrying out polymerase chain reaction and its basic updatings are stated. The step theory of accumulation of mutations in systems of correction of not coupled bases, oncogenes and tumor-suppressor genes in process of cancerogenesis and tumoral progression is described. The concept about regulation of activity of genes and mechanisms of its realization - methylation of deoxyribonucleic acid, ribozyme-mediated catalysis is resulted. Prospects of individual genic mapping and uses of phenomenon of ribonucleic acid-interferences for suppression of activity of oncogenes in quality target-therapies are designated. Article shows need of use for the big oncological centers of the equipment for polymerase chain reaction technology.

**Key words:** polymerase chain reaction, oncogenes, tumor-suppressor genes, epigenetics, methylation of deoxyribonucleic acid.