

## Молекулярно-генетические исследования в онкологии: от цитогенетики к эпигенетике

**Цепенко В.В., к.б.н.**

с.н.с. лаборатории молекулярно-генетической  
патологии клинко-морфологического отдела  
МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ  
радиологии» МЗ РФ, Обнинск

### Традиционная онкоцитогенетика

- Основана на исследовании самих опухолевых клеток.
- Невозможна без получения метафазных пластинок.
- При гематологических заболеваниях - аспират клеток костного мозга, при лимфомах – биопсия лимфоузла, при солидных опухолях – биопсия опухоли.
- Периферическая кровь **не информативна** для цитогенетического анализа большинства пациентов с лимфомами и солидными опухолями.
- Прямое приготовление препаратов, либо культивирование в течение 24-96 часов.
- Хромосомы, полученные из костного мозга, лимфоузлов или солидных опухолей, часто имеют плохую морфологию.

## G-дифференциальная окраска



G-дифференциальная окраска. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ)  $i(7)(q11)$   
 Идеограмма хромосомы 8 (на различное число бэндов)  
<http://atlasgeneticsoncology.org>

### Молекулярная цитогенетика (FISH)

Метафазный FISH

Интерфазный FISH

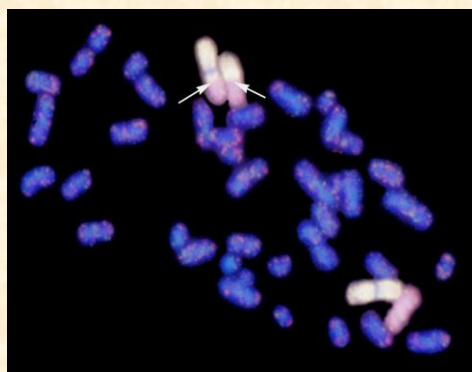
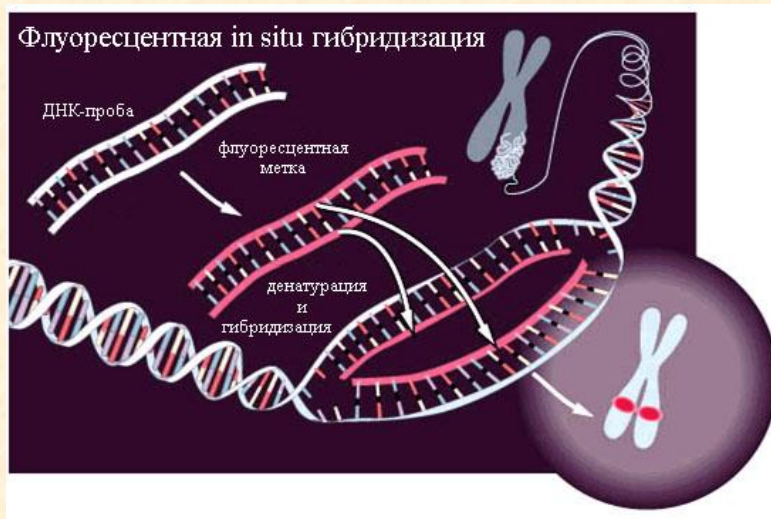
FISH на растянутой ДНК

Многоцветный FISH

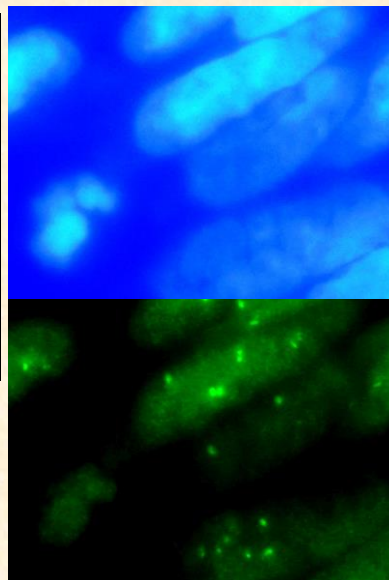
Сравнительная геномная гибридизация  
(СГГ)

СГГ на микрочипах (эррей)

## Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH)

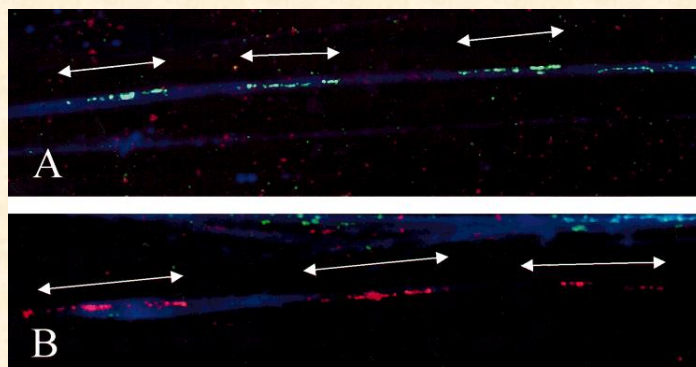


Метафазный FISH  
Полная транслокация t(2;4))



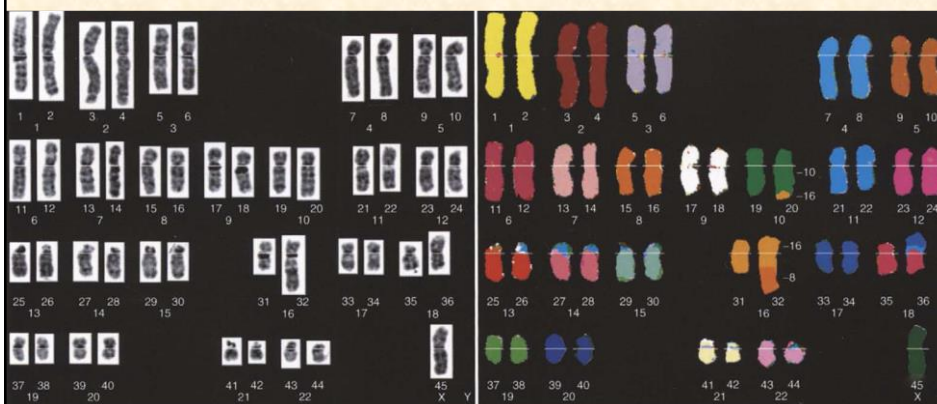
I-FISH. Рак желудка.  
Увеличение числа копий гена AURKA

## FISH на растянутой ДНК



Клеточная линия рака молочной железы. Одновременная амплификация генов *Her2/neu* (A) и *TOP2A* (B)  
*Jarvinen et al., 1999 Genes, Chrom. Can. 26:142-150*

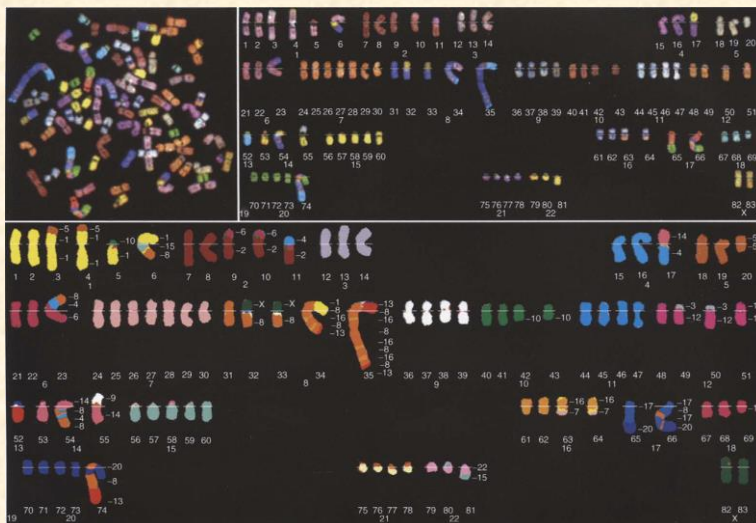
## Многоцветное кариотипирование Многоцветный FISH (M-FISH)



Клеточная линия рака прямой кишки.  $der(10) t(10;16)$ ,  $der(16) t(8;16)$  и  $der(18) t(17;18)$

*Molecular Genetic Pathology, 2009*

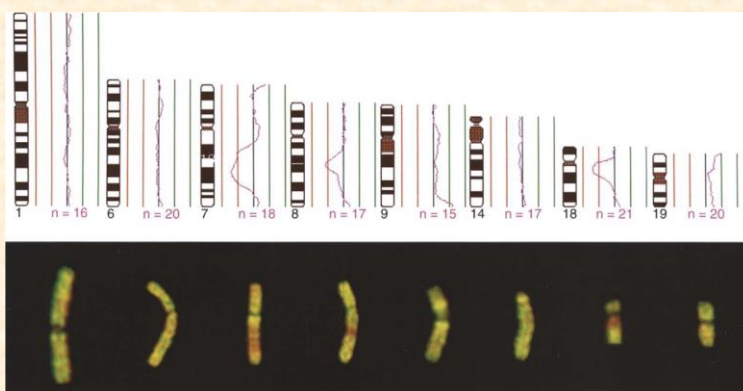
## Спектральное кариотипирование (SKY)



Рак молочной железы. Клетка с множественными перестройками.

*Molecular Genetic Pathology, 2009*

## Сравнительная геномная гибридизация (СГГ, CGH)



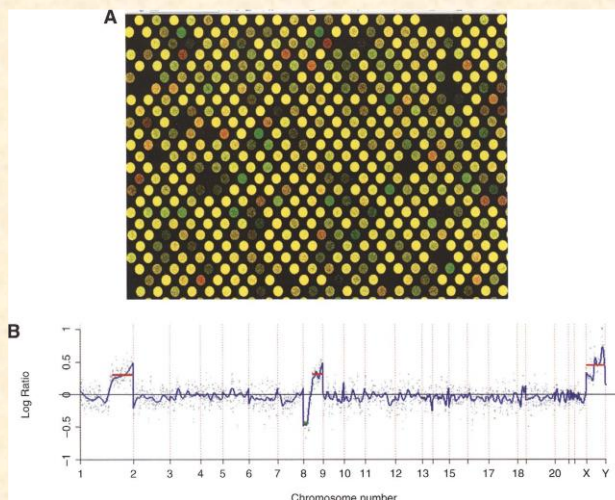
Опухоль тела матки.

Профили флуоресценции (верхняя панель) хромосом (нижняя панель).

Наблюдаются нарушения в хромосомах 7, 8 и 18

*Molecular Genetic Pathology, 2009*

## СГГ на микрочипах (эrray СГГ, aCGH)



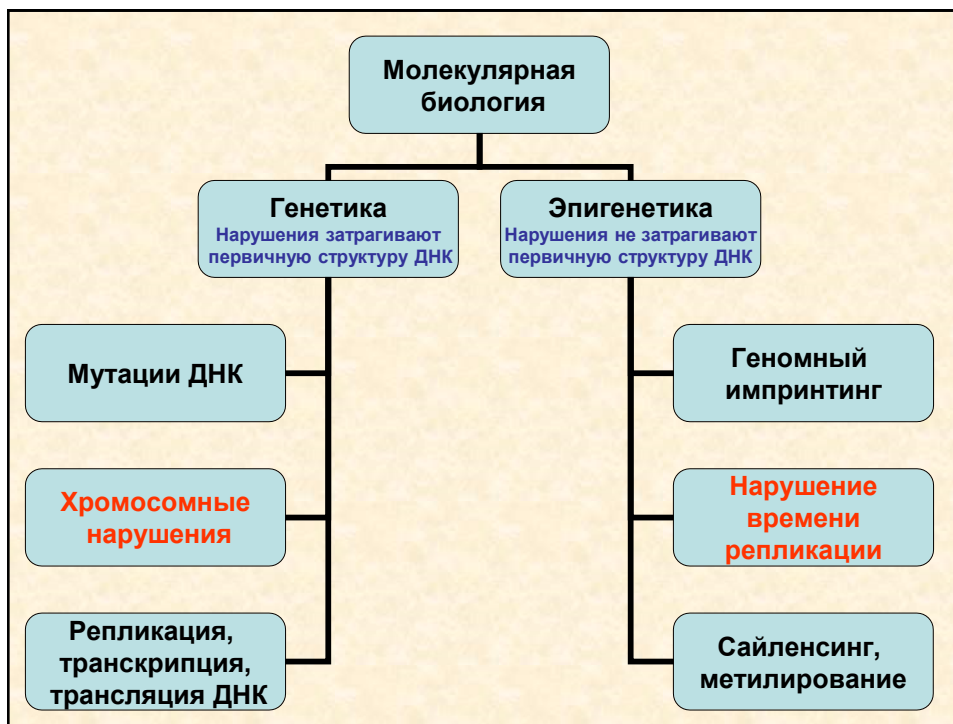
А) Часть изображения гепатоцеллюлярной карциномы.

В) Профиль нарушений опухоли. Нарушения наблюдаются в плечах q хромосом 1 и 8 и в плече p хромосомы 8.

(Molecular Genetic Pathology, 2009)

## Границы применения цитогенетических методов

- **ТЦ** – Трудоемкость, требует очень высокой квалификации специалиста, зависит от МИ, трудность интерпретации не-клоновых aberrаций.
- **I-FISH** требуется знание мишени. Дорогое оборудование.
- **FISH на растянутой ДНК** требует специальных техник подготовки мишени ДНК на предметном стекле. Слишком трудоемко для рутинного клинического использования.
- **M-FISH/SKY** – метафазные пластинки высокого качества. Стоимость оборудования и зондов находятся за пределами того, что может себе позволить большинство клинических лабораторий. Не позволяет обнаруживать внутрихромосомные нарушения.
- **CGH и aCGH** не применимы к хромосомным нарушениям, при которых не меняется копияность, таких как сбалансированные транслокации или инверсии. Большой объем данных затрудняет интерпретацию результатов.



## Время репликации – одна из эпигенетических характеристик генома

- Инициация репликации происходит одновременно, занимает короткий промежуток и остается практически синхронной в следующих клеточных циклах.
- Этот процесс называется **программой времени репликации**.
- Программа времени репликации митотически стабильна, наследуема и является устойчивой эпигенетической характеристикой всех эукариотических хромосом.
- Поздно реплицирующиеся регионы генома имеют более высокую скорость спонтанного мутагенеза, по сравнению с рано реплицирующимися регионами.
- Искусственная задержка инициации репликации ДНК увеличивает частоту мутагенных явлений.



Используя данный метод ряд зарубежных авторов провели исследования лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) генов *TP53*, *HER-2/neu*, *C-MYC*, *RB1*, *AML1* у человека и получили следующие результаты:

- у здоровых лиц частота ЛАР изученных генов изменяется в пределах 12%-18%;
- у онкологических больных (лимфомами, хроническим лимфоцитарным лейкозом, хроническим миелоидным лейкозом, больных почечно-клеточными карциномами, раком простаты, раком молочной железы) - в пределах 28% - 39%;
- частота лимфоцитов с асинхронной репликацией генов увеличивается по мере озлокачествления заболеваний;
- потеря синхронности репликации у онкологических больных – это обратимый эпигенетический феномен связанный, в том числе, и с аномальным метилированием.



## Обратимость асинхронной репликации и эпигенетическая терапия

- *in vitro* - культивирование лимфоцитов в присутствии ингибитора метилирования 5-азациитидина (AZA) - возвращение нарушенной программы времени репликации к нормальной. В культурах от здоровых лиц, присутствие AZA практически не изменяло частоту ЛАР. В культурах клеток онкогематологических больных частота ЛАР в культурах с AZA заметно снижалась. Аналогичные результаты были получены для больных раком простаты (*Korenstein-Ilan et al., 2002, Dotan et al., 2004, Nagler et al., 2010*).
- Аллогенная трансплантация костного мозга также снижает уровень ЛАР у онкологических больных до контрольного уровня и использование частоты ЛАР может быть показателем успешности лечения (*Nagler et al., 2010*).
- **Видаза** (5-азациитидин) и **децитабин** (5-аза-2'-дезоксцитидин) – одобрены для лечения FDA. **Зебуларин** – на стадии клинических разработок.
- Эпигенетическая терапия применяется для лечения больных с миелодиспластическим синдромом

### Асинхронная репликация генов *TP53* и *AURKA* в лимфоцитах периферической крови у больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта

Группа	Количество человек	Число проанализированных клеток	Среднегрупповая частота лимфоцитов с асинхронной репликацией гена	
			<i>TP53</i>	<i>AURKA</i>
Контрольная	<b>30</b>	<b>9 600</b>	<b>17,2±0,5</b>	<b>19,6±0,5</b>
больные с неопухоловой патологией ЖКТ	<b>13</b>	<b>3 900</b>	<b>19,5±0,8</b>	<b>24,8±0,5</b>
больные солитарным раком желудка	<b>68</b>	<b>20 400</b>	<b>26,1±0,5</b>	<b>32,1±0,5</b>
больные с полинеоплазиями	<b>38</b>	<b>11 400</b>	<b>32,5±0,5</b>	<b>39,3±0,6</b>

Среднегрупповые частоты лимфоцитов с асинхронной репликацией генов *TP53* и *AURKA* достоверно отличаются друг от друга и увеличиваются по мере нарастания нарушений в организме человека

## **Заключение**

Молекулярная цитогенетика дает возможность проводить количественную оценку не только генетических, но и эпигенетических нарушений. Это делает ее удобным инструментом для применения в клинической практике современного онколога.

**Спасибо за внимание**