



eНано

ЭЛЕКТРОННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
ДЛЯ НАНОИНДУСТРИИ

ОТКРЫТЫЙ ЛЕКТОРИЙ

**ВМЕСТЕ ПРОТИВ РАКА:
НАНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ
МЕЛАНОМЫ**

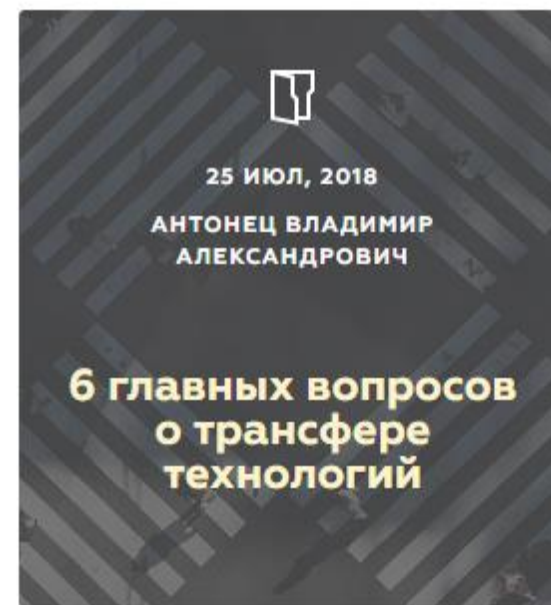
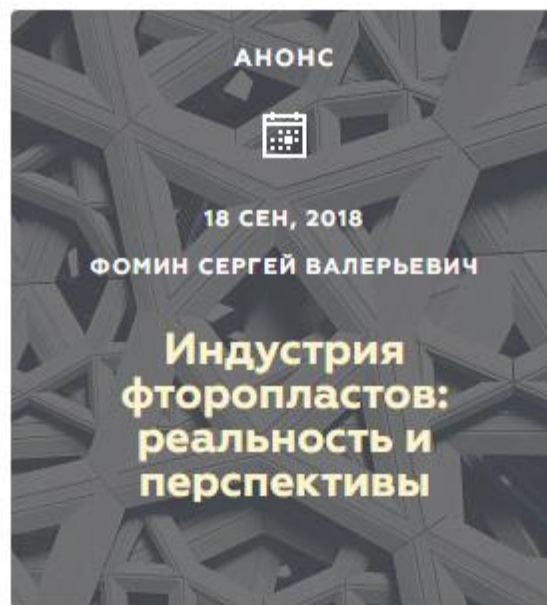
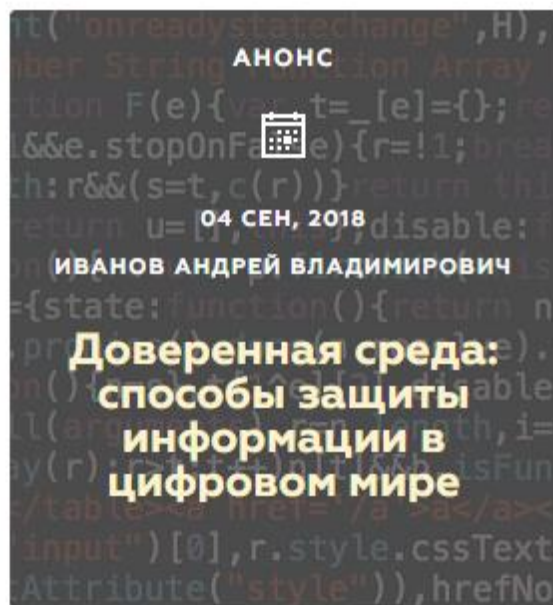
вебинар

10 октября 2018 года

18:00 мск



«Открытый лекторий» eНано – вебинары и лекции от ведущих ученых и лидеров бизнеса об актуальных результатах научных исследований в высокотехнологичной сфере



Генеральный партнер проекта –
Фонд инфраструктурных и образовательных программ РОСНАНО

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»



Антонова Елена
Ивановна
директор центра
профессор, д.б.н.



Соловьев Алексей
Вячеславович
зам.директора центра
доцент, к.б.н.

Вы узнаете о:

- молекулярно-генетических механизмах развития меланомы;
- подходах к комплексной диагностике меланомы с использованием молекулярных маркеров;
- применении нанотехнологических методов в диагностике меланомы и перспективах их внедрения в практику организаций здравоохранения

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ НА ВЕБИНАРЕ

- Вопросы докладчику можно задавать по ходу вебинара во вкладке **ВОПРОСЫ**
- По техническим и другим вопросам просьба пользоваться вкладкой **ЧАТ**
- По итогам вебинара все зарегистрированные участники получат ссылку на **ВИДЕОЗАПИСЬ** и презентацию
- Информация о проекте на сайте **edunano.ru**



eНано

ЭЛЕКТРОННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
ДЛЯ НАНОИНДУСТРИИ

Вместе против рака: наномолекулярные методы диагностики меланомы

Антонова Елена Ивановна, проф., д.б.н.

Соловьев Алексей Вячеславович, доц., к.б.н.





МЕЛАНОМА

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Новообразование (или опухоль) – это аномальные разрастания ткани без какой-либо очевидной функции.

Доброкачественная опухоль производит только избыточную массу клеток, не влияя на функцию окружающей нормальной ткани.

Злокачественная опухоль – должна быть инвазивной, то есть обладать способностью врастать в окружающую ткань и влиять на её функцию. Опухоли могут образовывать колонии во многих местах по всему телу (метастазы).

Отличительная особенность раковых клеток – генетическая нестабильность. Мутации, которые изменяют экспрессию генов, признаны общей чертой всех раковых заболеваний.

Этиология раковых заболеваний:

- мутации в ДНК (большинство типов рака);
- эпигенетические факторы;
- вирусная инфекция (редко).

Особую группу составляют, т.н. «болезни нуклеиновых кислот», обусловленные накоплением генетических повреждений в соматических клетках пациентов. Хотя все онкологические заболевания могут быть отнесены к группе «болезней нуклеиновых кислот», некоторые из них одновременно могут быть наследственными или мультифакториальными.

Рак – генетическая болезнь

Онкоген (доминантные онкогены) – мутантный аллель протоонкогена, класса нормальных генов, кодирующих белки клетки, обеспечивающие рост и выживание клеток (позитивный контроль). Онкогены «облегчают» злокачественное перерождение, стимулируя пролиферацию или тормозя апоптоз. Онкогены кодируют такие белки, как:

- белки сигнальных путей пролиферации клеток (рецепторов, 1 и 2 мессенжеры от мембраны к ядру) ;
- факторы транскрипции, управляющие экспрессией обеспечивающих рост генов, сайленсоры и энхансеры, LCR, т.е. регуляция «генных сетей»;
- ингибиторы механизмов программируемой смерти клетки.

Онкогеном называется ген, который:

- а) в норме оказывает активирующее влияние на процессы пролиферации и/или препятствует клеточной гибели;
- б) активируется в опухолях.

Второй класс – супрессоры опухолей или рецессивные онкогены, называемые также *антионкогенами*. Кодлируемые этими генами белки часто являются негативными регуляторами клеточного роста и в норме обладают противоопухолевым эффектом.

Для появления или усиления трансформации необходима инактивация обоих членов каждой пары антионкогенов, имеющих в клетке.

Для антионкогенов характерны две главные особенности: «потеря гетерозиготности» и делеция одного из аллелей гена-супрессора сопровождается инактивацией оставшегося аллеля вследствие микромутации;

Характерные черты опухоли (D. Hanahan и R. Weinberg)

- 1) самодостаточность в отношении сигналов пролиферации, связанная с аутопродукцией факторов роста, рецепторов;
- 2) потеря чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации, обусловленная инактивацией супрессорных (антимитотических) белков;
- 3) замедление процессов программируемой клеточной гибели;
- 4) неограниченный репликативный потенциал клеток (преодоление «лимита Хэйфлика»), сопряжённый с реактивацией экспрессии фермента теломеразы;
- 5) самодостаточность в отношении сигналов пролиферации, связанная с аутопродукцией факторов роста, рецепторов;
- 6) потеря чувствительности к сигналам, сдерживающим процесс пролиферации, обусловленная инактивацией супрессорных (антимитотических) белков;

Генетические основы рака (Кинзлер, Фогельштайн)

гены-супрессоры опухолевого роста подразделяют на две группы:

- 1. «Хранители клеточного цикла» (ХКЦ) (gatekeepers).** Их белковые продукты способны сдерживать опухолевую прогрессию, ингибируя процессы, связанные с делением клетки. Дефекты этих генов определяют развитие опухоли. Гены ХКЦ управляют ростом клеток.
- 2. Гены «общего контроля»** (Баранова, Янковский 1998). Дефекты «генов общего контроля» приводят к повышению нестабильности генома, увеличению частоты возникновения мутаций, и, следовательно, к повышению вероятности повреждения генов, в том числе и «хранителей клеточного цикла». Дефект последних приводит к появлению опухоли.

Развитие опухоли:

1) инициация – первое мутационное событие (согласно 2-х ударной модели канцерогенеза, предложенной Knudson в 1971 г). Нарушение морфогенетических реакций. Локомоторный фенотип. Вирусы (саркома Рауса);

2) развитие опухоли – включает гены, синтезирующие декодирующую РНК, из которой образуются регуляторные микроРНК (miRNAs). Один из примеров — 100-кратное усиление экспрессии микроРНК miR-21 в многоформной глиобластоме;

продвижение (стимулирование или промотирование) – стимулирование клетки к вступлению в митоз;

3) прогрессия – многоступенчатый процесс. Инвазивность требует дополнительных мутаций. Разрастание опухоли до размеров, превышающих несколько миллиметров, зависит от ангиогенеза (формирование кровеносных сосудов).

Пути повреждения генов-супрессоров опухолевого роста :

1. делеции (потеря гетерозиготности);

2. точковые мутации:

сдвига рамки считывания

нонсенс-мутации

мутации сайтов сплайсинга

миссенс-мутаций

мутации в промоторной части генов,

мутации регуляторные области генов

3. метилирование промоторной области генов-супрессоров.

Меланома – злокачественная опухоль нейроэктодермального происхождения, развивающаяся из меланоцитов, расположенных преимущественно в коже.

- ▶ Агрессивное течение
- ▶ Метастазирует во все органы
- ▶ Излечение возможно только на ранних стадиях
- ▶ 10-летняя выживаемость – 42% при 1-2 стадиях

По данным ВОЗ, около 132000 новых случаев меланомы диагностируются во всём мире каждый год.

По некоторым данным каждый час от меланомы погибает 6 человек.

В России (по данным за 2014 год) 1 из 2000 человек имеет диагноз меланома, показатель запущенности достигает 22%, а около 12% заканчивается летальным исходом.



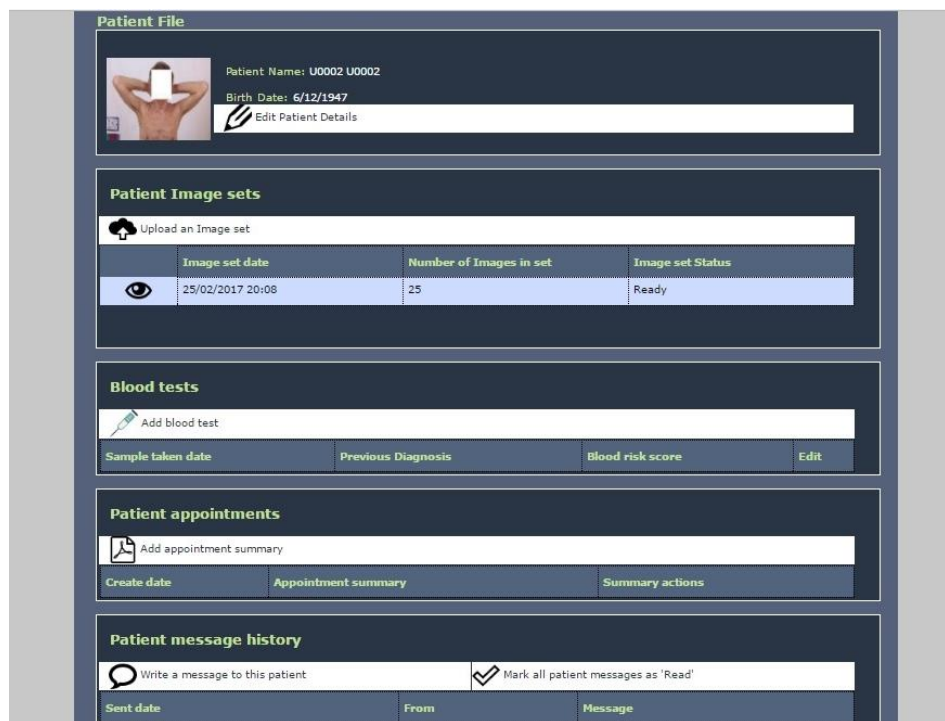
Критерии «высокого риска»

- ▶ ранее была диагностирована меланома, но успешно вылечена;
- ▶ случаи заболевания меланомой в семье;
- ▶ большое число родинок не теле (более 50 шт.) или имеется крупная родинка (диаметр более 2 см);
- ▶ диспластические или атипичные невусы;
- ▶ крупные врожденные пигментные невусы и родимые пятна (более 5% поверхности тела);
- ▶ светлая кожа, веснушки и светлые волосы;
- ▶ имеются перенесенные сильные солнечные ожоги;
- ▶ инсоляция более 6 часов в день;
- ▶ пигментная ксеродерма.

Скрининг кожных покровов

Система ABCDE (Фридман и др., 1985) для оценки опасности невусов (родинок):

- A** – асимметричность (от англ. asymmetry – асимметрия);
- B** – границы (контур): неровные или ровные, ясные (от англ. border – край);
- C** – цвет: одинаковый или нет в разных частях родинки (от англ. color – цвет);
- D** – диаметр (от англ. diameter – диаметр);
- E** – изменчивость (от англ. evolving – изменения).



Patient File

Patient Name: U0002 U0002
Birth Date: 6/12/1947
[Edit Patient Details](#)

Patient Image sets

[Upload an Image set](#)

Image set date	Number of Images in set	Image set Status
25/02/2017 20:08	25	Ready

Blood tests

[Add blood test](#)

Sample taken date	Previous Diagnosis	Blood risk score	Edit
-------------------	--------------------	------------------	------

Patient appointments

[Add appointment summary](#)

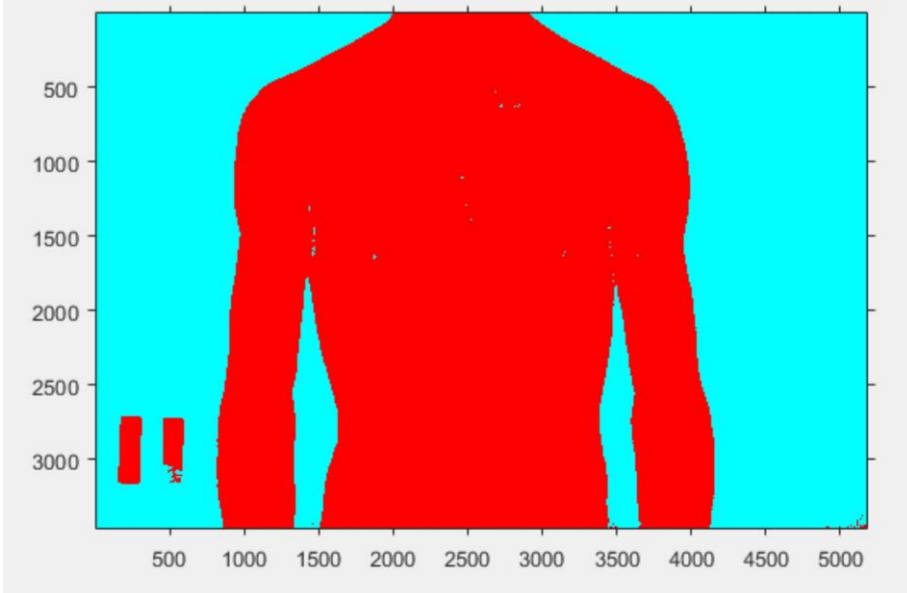
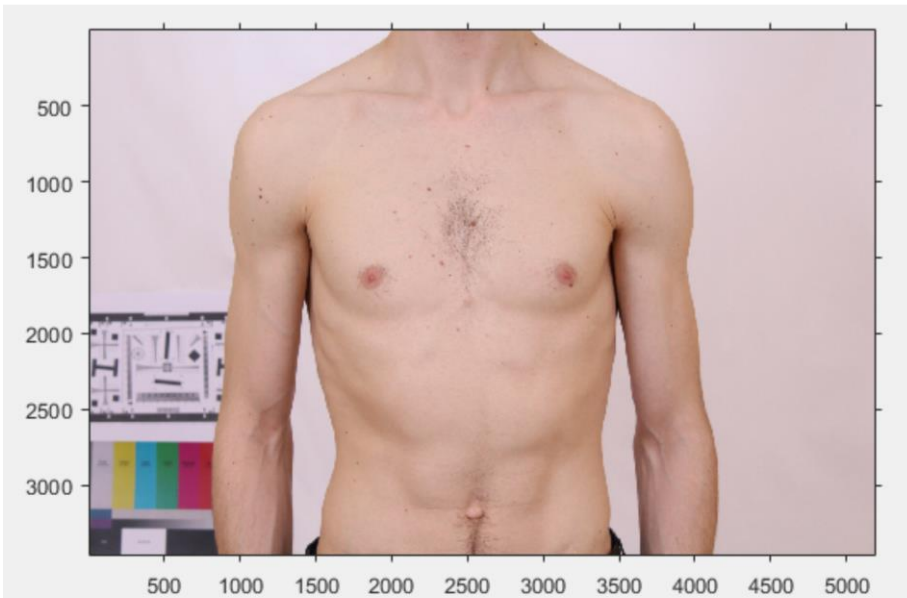
Create date	Appointment summary	Summary actions
-------------	---------------------	-----------------

Patient message history

[Write a message to this patient](#) Mark all patient messages as 'Read'

Sent date	From	Message
-----------	------	---------

TBP – total body photographing



№	ID (индивидуальный номер)	Риск
1	609516	0,78
2	610341	0,77
3	610957	0,77



МАРКЕРЫ МЕЛАНОМЫ И ИХ РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ МЕЛАНОМЫ

«ТРАДИЦИОННЫЕ» МАРКЕРЫ

№	Локализация карциномы		Опухолевые маркеры
1	Рак молочной железы		СА 15-3, РЭА, СА 19-9, НЕ4, СА 72-4 (гормоны: пролактин, эстрадиол)
2	Опухоли яичников	эпителиальные герминогенные гранулезоклеточные	СА 125, НЕ4, СА 72-4, СА 19-9 β ХГЧ, АФП эстрадиол, ингибин В
3	Опухоли яичек		β ХГЧ, АФП
4	Рак шейки матки		SCC, РЭА, TPS
5	Рак вульвы		SCC
6	Рак эндометрия		СА 125, НЕ4, СА 19-9, РЭА
7	Рак пищевода		SCC
8	Рак желудка		СА 72-4, РЭА, СА 19-9
9	Колоректальный рак		РЭА, СА 19-9, гемоглобин в кале (Копро Нв, количественный), Tu M2-РК в кале и копро Нв-экспресс (качественный)
10	Рак поджелудочной железы		СА 19-9, РЭА
11	Гепатоцеллюлярный рак		α-фетопротеин, РИВКА-II
12	Рак мочевого пузыря		UBC, Cyfra 21-1, ВТА, NMP-22, НЕ4
13	Рак почки		Tu M2-РК, SCC, СА 125, НЕ4
14	Рак предстательной железы		ПСА _{общ} , ПСА _{своб} / ПСА _{общ} , [-2] _{про} ПСА, индекс здоровья простаты (PHI), НЕ4
15	Рак легкого:	аденокарцинома плоскоклеточный крупноклеточный мелкоклеточный	РЭА, Cyfra 21-1 Cyfra 21-1, SCC, РЭА Cyfra 21-1, SCC, РЭА ProGRP, HCE, РЭА
16	Рак щитовидной железы: фолликулярный; папиллярный медулярный		Тиреоглобулин (ТГ), антитела к ТГ, ТТГ Кальцитонин, РЭА
17	Метастазы в костях		Bone TRAP-5b
18	Меланома		S-100
19	Нейроэндокринные опухоли		Хромогранин А, 5-ГИУК, гастрин 17

ОМ при злокачественной меланоме

Маркер	Цель использования
S-100	Мониторинг терапии у пациентов с метастазирующей меланомой
	Определение прогноза
	Определение ответа на терапию
VEGF	Маркер прогрессии заболевания
	Определение прогноза: высокий уровень ассоциирован с поздней стадией заболевания
bFGF	Повышенный уровень маркера коррелирует с поздней стадией заболевания и коротким периодом безрецидивной и общей выживаемости
CD44	Определение прогноза
siCAM	Определение прогноза
siL-2R	Определение прогноза; оценка терапии IL-2
siL-6	Предиктор ответа на биотерапию; более высокий уровень ассоциирован с большим объемом опухоли
siL-8	Определение массы опухоли
NSE	Оценка прогноза: более высокий уровень у больных с III/IV стадиями по сравнению с I/II стадиями
СРБ	Предиктор выживаемости при поздних стадиях меланомы; маркер прогрессии заболевания

(из: Клинико-лабораторная концепция исследования серологических опухолеассоциированных маркеров и некоторых гормонов у онкологических больных. М.: «МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ИМИРЦ» Минздрава России, 2016).

1. Опухолевые маркеры (ОМ) повышаются в сыворотке крови не только при онкологических, но и (в небольшом проценте случаев) при неонкологических заболеваниях и доброкачественных опухолях. Поэтому использование опухолевых маркеров для диагностики рака имеет ограниченное значение. В то же время сам факт повышения опухолевого маркера свидетельствует о наличии патологического процесса и является основанием для дообследования больного.

Белок S-100

Определение сывороточного уровня S-100 у больных меланомой в странах Центральной Европы находит применение как фактор прогноза, а также для оценки эффективности лечения больных и мониторинга пациентов в период ремиссии для доклинического выявления прогрессирования заболевания. Руководство по меланоме в Германии рекомендует определение S-100 в крови всех больных с толщиной опухоли более 1,0 мм.

Уровень белка S-100 на старте лечения является независимым фактором прогноза для больных с метастазирующей меланомой (стадии III и IV).


При IV стадии медиана продолжительности жизни больных:

менее 0,2 мкг / л – 14 месяцев

3,0 мкг/л – 3 месяца

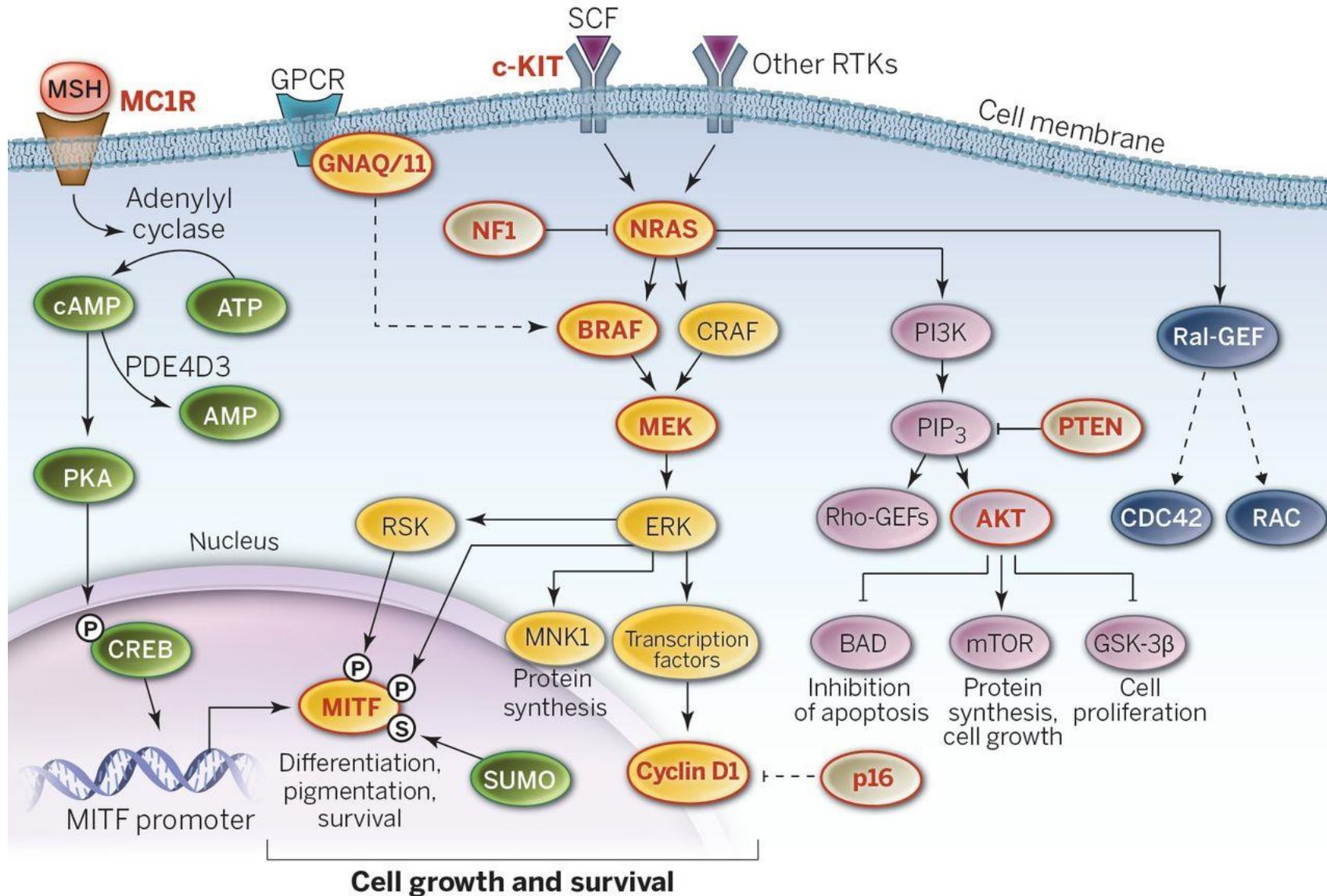
Обнаружение повышенной сывороточной концентрации S-100 у первичных больных позволяет выделить группу пациентов высокого риска метастазирования, которые нуждаются в адъювантной (послеоперационной) терапии.

Ложно-положительные результаты: острые мозговые нарушения, переломы костей, оперативные вмешательства, острые воспалительные и инфекционные заболевания (особенно почек), гистиоцитоз X, опухоли мозга.



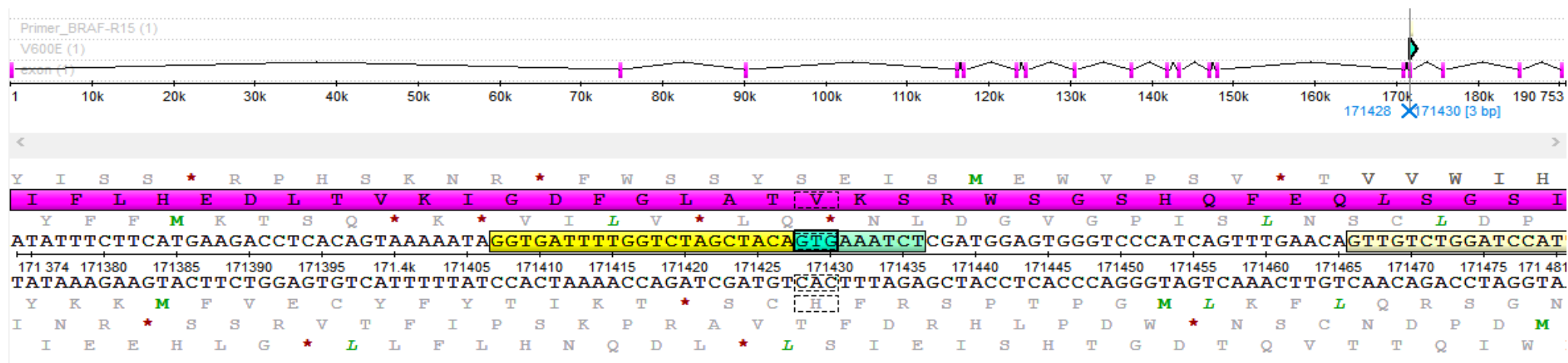
МАРКЕРЫ МЕЛАНОМЫ И ИХ РОЛЬ В ДИАГНОСТИКЕ МЕЛАНОМЫ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ



Гиперактивация каскада RAS/RAF/MEK/ERK в 75% случаев меланомы.

Мутации BRAF встречаются в 55% случаев метастазирующей меланомы.



V600E / T1799A

Мутация значительно повышает уровень киназной активности, что приводит к повышению уровня пролиферации и роста неоплазий.

Концентрация мутации BRAF в плазме:

0,8 ± 0,2% в контрольной группе (44,6 пкг/мл)

2,6 ± 1,3% у пациентов с раком кожи (не меланома) (11,7 пкг/мл)

4,2 ± 1,3% у пациентов с неинвазивной формой меланомы (267,9 пкг/мл)

(из Pinzani et al. Allele specific Taqman-based real-time PCR assay to quantify circulating BRAFV600E mutated DNA in plasma of melanoma patients // Clinica Chinica Acta. 2010. Vol. 411. P. 1319–1324)

Сигнальный путь	Ген	Частота и характер изменений	Функция
MAPK – митогин-активированные протеиназы	KIT (с-KIT)	Активирующие мутации в 23%, чаще в меланомах слизистых, ладоней и подошве, на хронически облучаемой УФ коже	Рецептор фактора роста стволовых клеток
	NRAS	Мутации в 10-26%, преимущественно на периодически облучаемой УФ коже	Передача пролиферативных сигналов от рецепторов факторов роста
	BRAF	Мутации в 60-80% меланом, преимущественно на периодически облучаемой УФ коже	
	MEK	Активируется в связи с мутациями в вышестоящих звеньях сигнальной цепи	Интеграция сигналов от различных факторов роста и активация пролиферации
PI3K/AKT фосфоинозитол-3	PTEN	Инактивирующие мутации в 10-30% меланом	Антионкоген, торможение пролиферации, регуляция дифференцировки и поддержания популяции стволовых клеток
	AKT	Гиперэкспрессия или активация в 43-70% меланом	Регуляция пролиферации, выживания клетки, дифференцировки и изменении цитоскелета, резистентность к цитостатикам

В 5-14% случаев отмечается **наследственность при меланоме:**

- редкие герминальные мутации генов-регуляторов клеточного цикла CDKN2A и CDK4;
- ген MITF, отвечающий за гомеостаз меланоцитов;
- полиморфизмы гена MC1R.

Полиморфизмы гена MC1R (рецептор меланокортина 1)

p.V60L и p.R151C: ассоциируется с высоким риском развития меланомы.

p.V92M: обычно ассоциируется с рыжими волосами и плохо загораемой кожей.

Определяет высокий риск развития меланомы. Присутствие аллеля связывается с повышенным риском развития болезни Альцгеймера.

p.R160W: Значительно ассоциируется с риском развития меланомы. Ассоциируется с рыжими волосами и светлой кожей.

p.R163Q: Значительно ассоциируется с риском развития меланомы.

Пациенты с вариантами MC1R имеют в 5–15 раз больший риск развития меланомы с мутацией BRAF независимо от УФ-инсоляции.

Полиморфизмы гена CDKN2A

Мутации гена CDKN2A обнаруживают в 20–40 % случаев семейной меланомы.

Мутации p16INK4a являются причиной возникновения 1400–2800 новых (2-4%) случаев меланомы в США ежегодно.

Мутация CDKN2A (дупликация кодона **R112**), затрагивающая оба белка – p16^{INK4a} и p14^{ARF}, доминирует у носителей наследственной меланомы в шведских семьях.

Существует предположение, что мутация CDKN2A у носителей наследственной меланомы в шведских семьях связана с повышенным риском развития онкологических заболеваний у курильщиков.

Полиморфизмы гена CDK4

Нарушения гена CDK4. Активирующие мутации связаны с небольшим процентом случаев меланомы у детей. Амплификация CDK4 характерна для акральная и мукозальной меланомы и не встречается в меланоме с гомозиготной потерей p16INK4a.

Ген	Полиморфизм	Частота минорного аллеля согласно dbSNP	Частота аллеля у пациентов группы высокого риска	Частота у пациентов группы с подтверждённым диагнозом
CDKN2A	rs104894094 p.G101W, c.301G>T	0,00002 – 0,00004	0	0
MC1R	rs1805005 p.V60L/F, c.178G>C/T	0,0353 – 0,0961	0,0588	0,15
MC1R	rs1805008 p.R160W/C/*, c.478C>T	0,0146 – 0,0556	0,0980	0,15
MC1R	rs885479 / rs1042809 p.R163Q, c.488G>A	0,0371 – 0,1913	0,0196	0,15
MC1R	rs2228479 p.V92M, c.274G>A	0,0633 – 0,0797	0,1176	0,15
MC1R	rs1805007 / rs3212380 p.R151C, c.451C>T	0,0186 – 0,0562	0,0196	0,05
MITF	rs149617956 p.E318K, c.952G>A	0,0008 – 0,0022	0	0

	Группа пациентов с высоким риском развития меланомы			Группа пациентов с подтвержденным диагнозом меланомы		
	возраст			возраст		
	ВСЕ	18-39	40–78	ВСЕ	18-39	40–82
Количество пациентов, имеющих SNP-варианты гена MC1R	29,4 %	35,0 %	25,8 %	55,0 %	33,3 %	58,5 %

Микро-РНК

Функция: РНК-интерференция и пост-транскрипционная регуляция генной активности (разрезание мРНК, дестабилизация мРНК путем укорочения поли-А-хвоста, уменьшение эффективности трансляции)

Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma

Stefano Fogli¹, Beatrice Polini¹, Sara Carpi¹, Barbara Pardini²,
Alessio Naccarati², Nevio Dubbini³, Maria Lanza³,
Maria Cristina Breschi¹, Antonella Romanini³ and Paola Nieri¹

Abstract

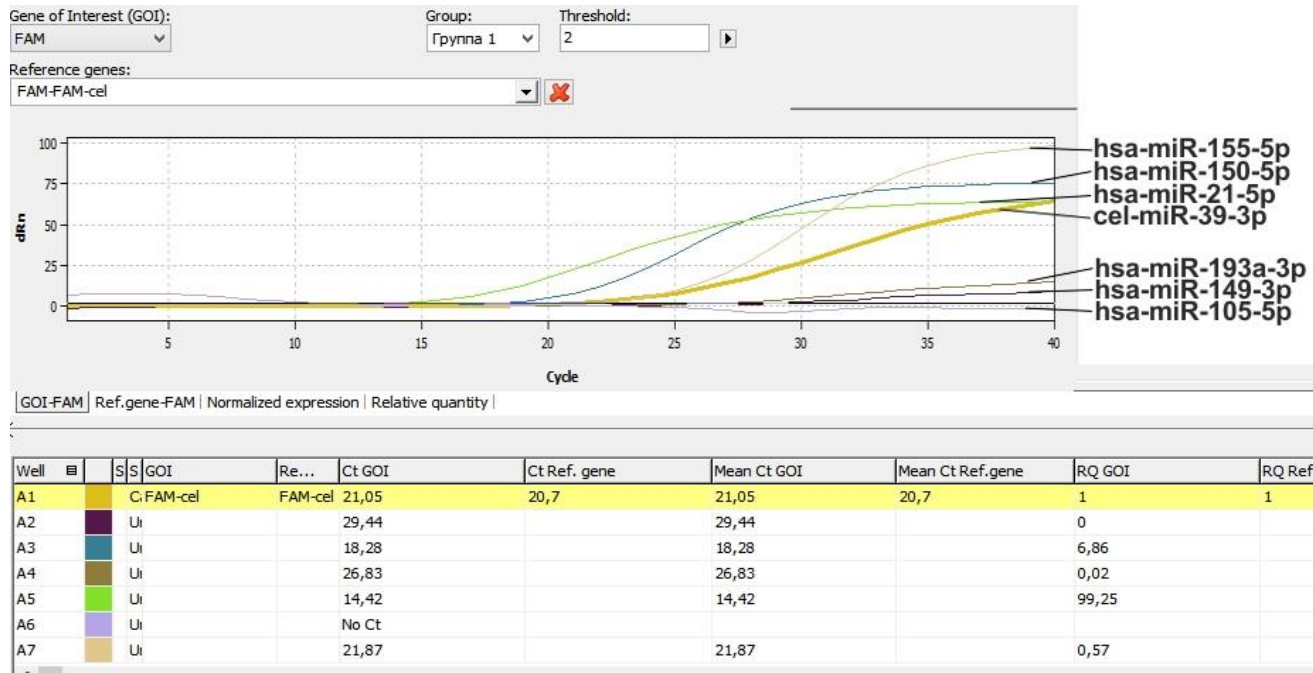
Melanoma is a devastating disease with few therapeutic options in the advanced stage and with the urgent need of reliable biomarkers for early detection. In this context, circulating microRNAs are raising great interest as diagnostic biomarkers. We analyzed the expression profiles of 21 selected microRNAs in plasma samples from melanoma patients and healthy donors to identify potential diagnostic biomarkers. Data analysis was performed using global mean normalization and NormFinder algorithm. Linear regression followed by receiver operating characteristic analyses was carried out to evaluate whether selected plasma miRNAs were able to discriminate between cases and controls. We found five microRNAs that were differently expressed among cases and controls after Bonferroni correction for multiple testing. Specifically, miR-15b-5p, miR-149-3p, and miR-150-5p were up-regulated in plasma of melanoma patients compared with healthy controls, while miR-193a-3p and miR-524-5p were down-regulated. Receiver operating characteristic analyses of these selected microRNAs provided area under the receiver operating characteristic curve values ranging from 0.80 to 0.95. Diagnostic value of microRNAs is improved when considering the combination of miR-149-3p, miR-150-5p, and miR-193a-3p. The triple classifier had a high capacity to discriminate between melanoma patients and healthy controls, making it suitable to be used in early melanoma diagnosis.

Tumor Biology
May 2017: 1–8
© The Author(s) 2017
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1010428317701646
journals.sagepub.com/home/tub

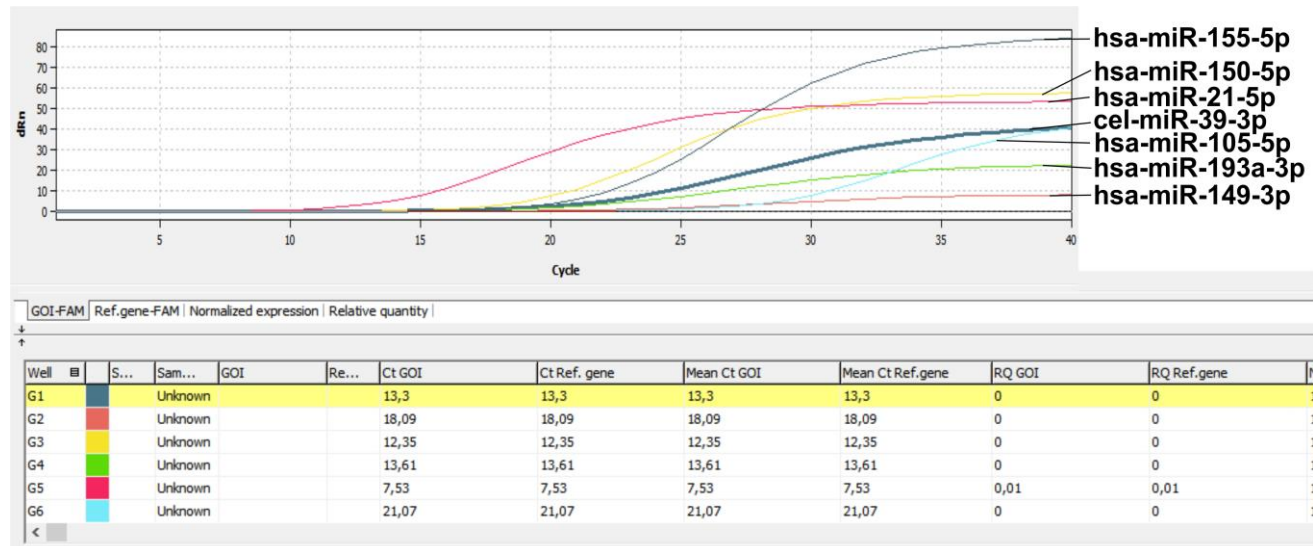

GMN			NormFinder		
miRNA	p value	Gene regulation	miRNA	p value	Gene regulation
miR-149-3p	1.3×10^{-8}	↑	miR-150-5p	2.8×10^{-12}	↑
miR-193a-3p	1.3×10^{-6}	↓	miR-149-3p	3.4×10^{-12}	↑
miR-150-5p	1×10^{-5}	↑	miR-193a-3p	1.3×10^{-6}	↓
miR-524-5p	1×10^{-5}	↓	miR-15b-5p	1.3×10^{-5}	↑
miR-200c-3p	1×10^{-4}	↓	miR-524-5p	2.4×10^{-5}	↓
miR-15b-5p	2.3×10^{-4}	↑	miR-200c-3p	9.5×10^{-3}	↓
miR-425	9.5×10^{-4}	↓	miR-145-5p	3.1×10^{-2}	↑
let-7-5p	2.2×10^{-3}	↓			
miR-1250-5p	6.1×10^{-3}	↓			
miR-4270	6.4×10^{-3}	↓			
miR-338-3p	1.2×10^{-2}	↓			
miR-9-5p	2.3×10^{-2}	↓			
miR-106-5p	4.4×10^{-2}	↓			

miRNA: microRNA; GMN: global mean normalization; ↑: up-regulated; ↓: down-regulated

Data were normalized to mean expression value of all expressed miRNAs and with NormFinder. Significant p values (<0.05) were obtained by Wilcoxon test.



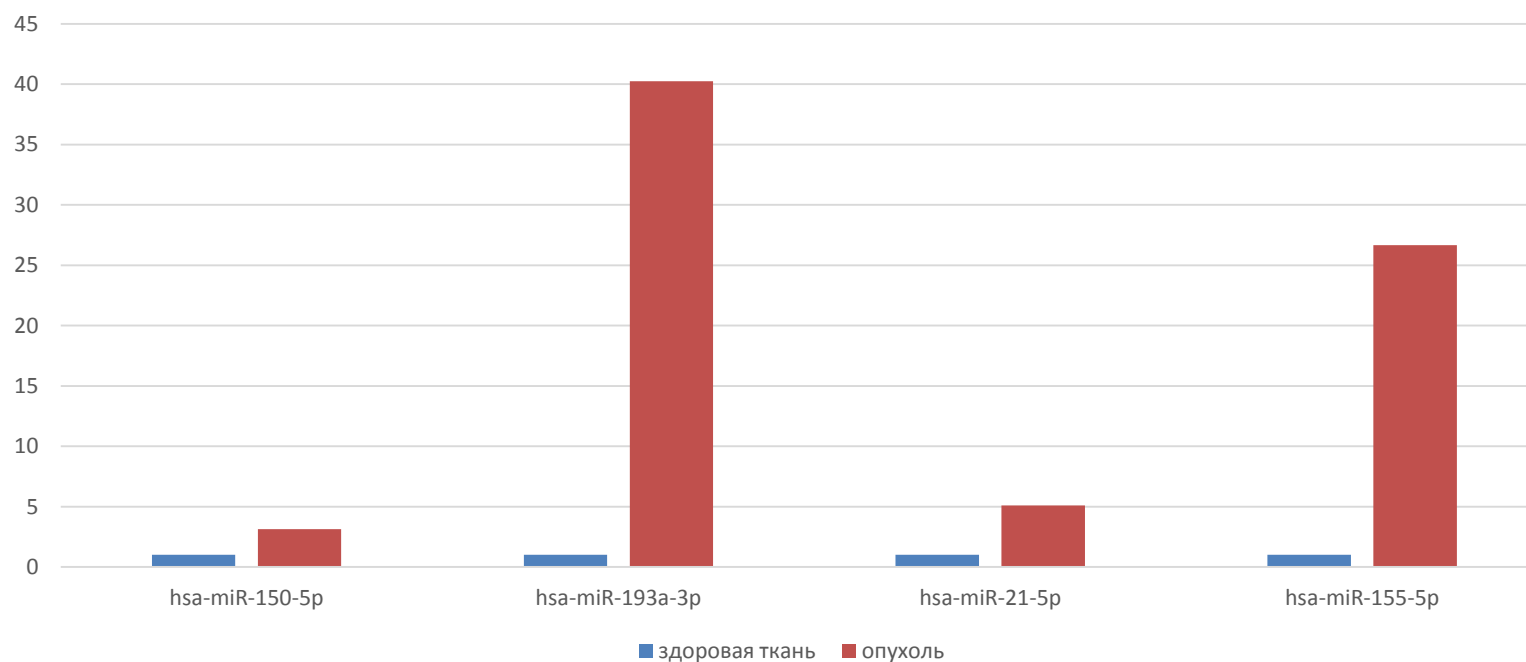
Показатели уровни микроРНК здоровой ткани (родинки) после ПЦР-РВ с применением TaqMan-зондов. Исходная концентрация контрольной микроРНК cel-miR-39-3p: 0,1 мкМ /100 мг исходного образца.



Показатели уровни микроРНК ткани опухоли после ПЦР-РВ с применением TaqMan-зондов. Исходная концентрация контрольной микроРНК cel-miR-39-3p: 0,1 мкМ /100 мг исходного образца.

микроРНК	Пациенты контрольной группы, RQ	Пациенты с подтвержденным диагнозом, RQ
hsa-miR-149-3p	0	0
hsa-miR-150-5p	102,18 ± 9,2	4,90 ± 0,98
hsa-miR-193a-3p	0,0998 ± 0,0081	0 (не детектируется)
hsa-miR-21-5p	19,01 ± 0,79	16,79 ± 0,55
hsa-miR-105-5p	0 (не детектируется)	0 (не детектируется)
hsa-miR-155-5p	0,5885 ± 0,1220	0,011583 ± 0,01132

Уровни микроРНК в крови



Уровни микроРНК в здоровой ткани и опухоли.

МАРК-ингибиторы тирозинкиназ

BRAF

- ✓ Вемурафениб
- ✓ Дабрафениб
- ✓ Кобиметиниб

MEK

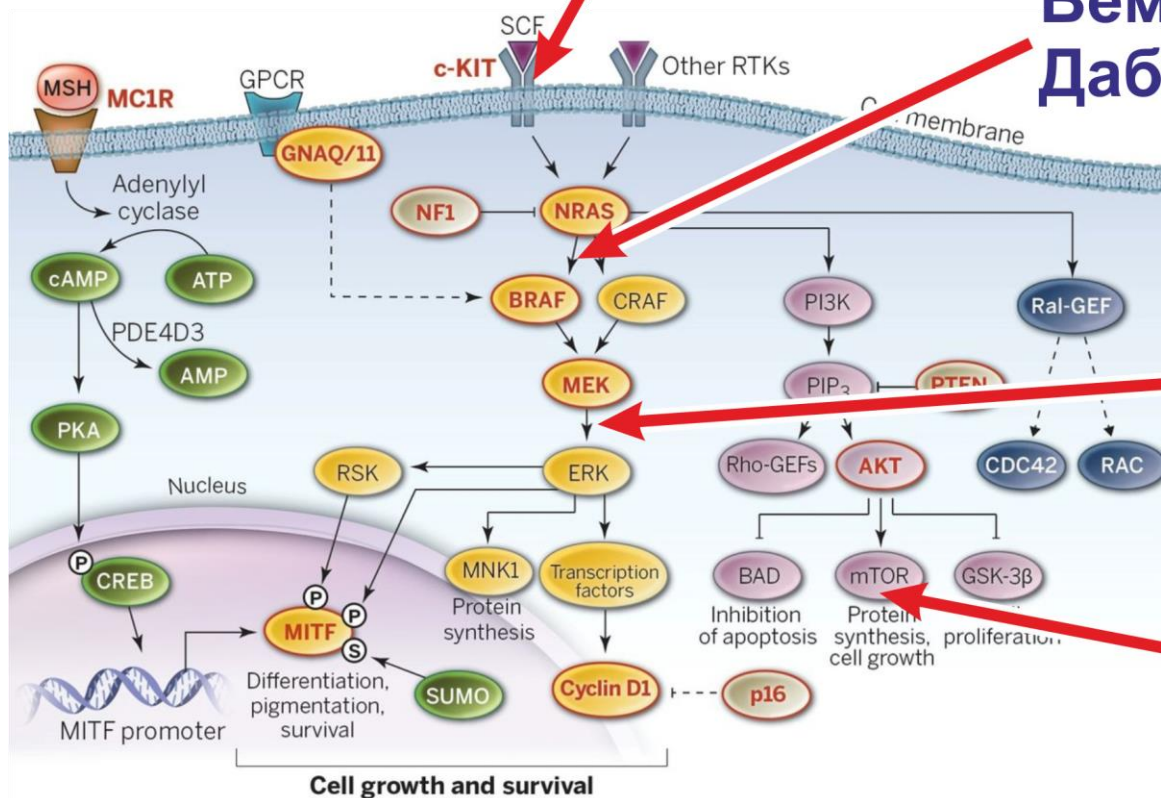
- ✓ Траметиниб
- ✓ Кобиметиниб


Иматиниб
Сунитиниб
Дазатиниб

Вемурафениб
Дабрафениб

Траметиниб

Темзиролимус

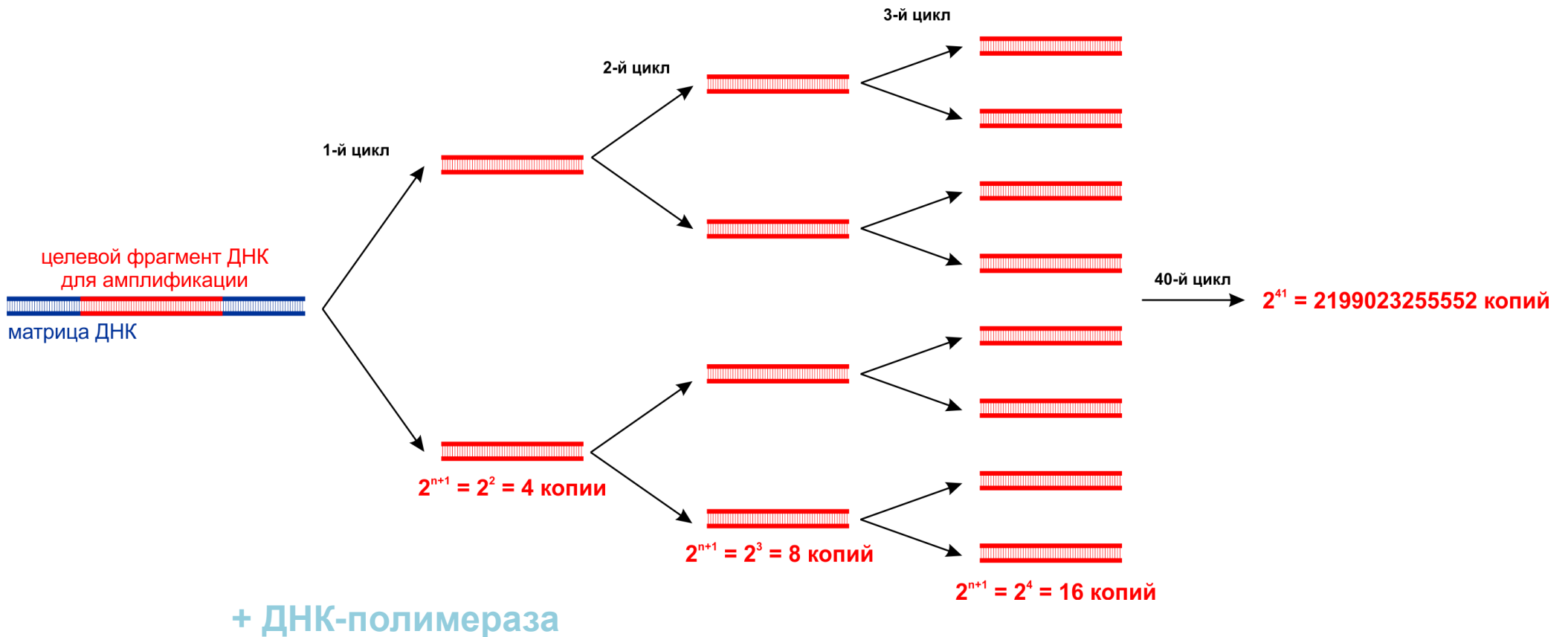




НАНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДХОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ МЕЛАНОМЫ

ДНК-ЗОНДЫ

Полимеразная цепная реакция



ДНК-зонд – меченный каким-либо способом наноразмерный олигонуклеотид, использующийся для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК.

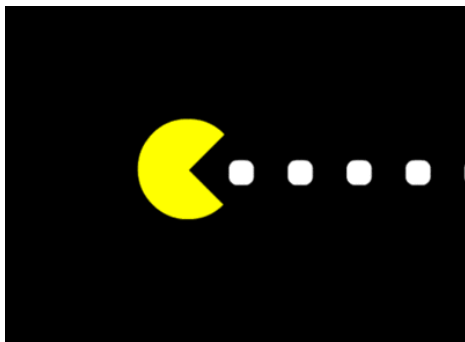
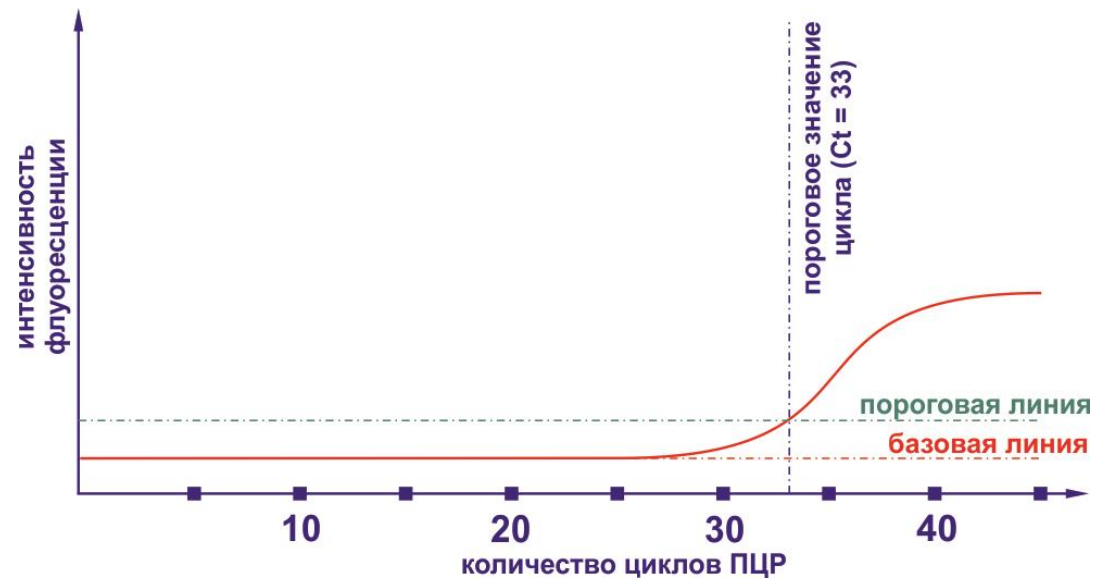
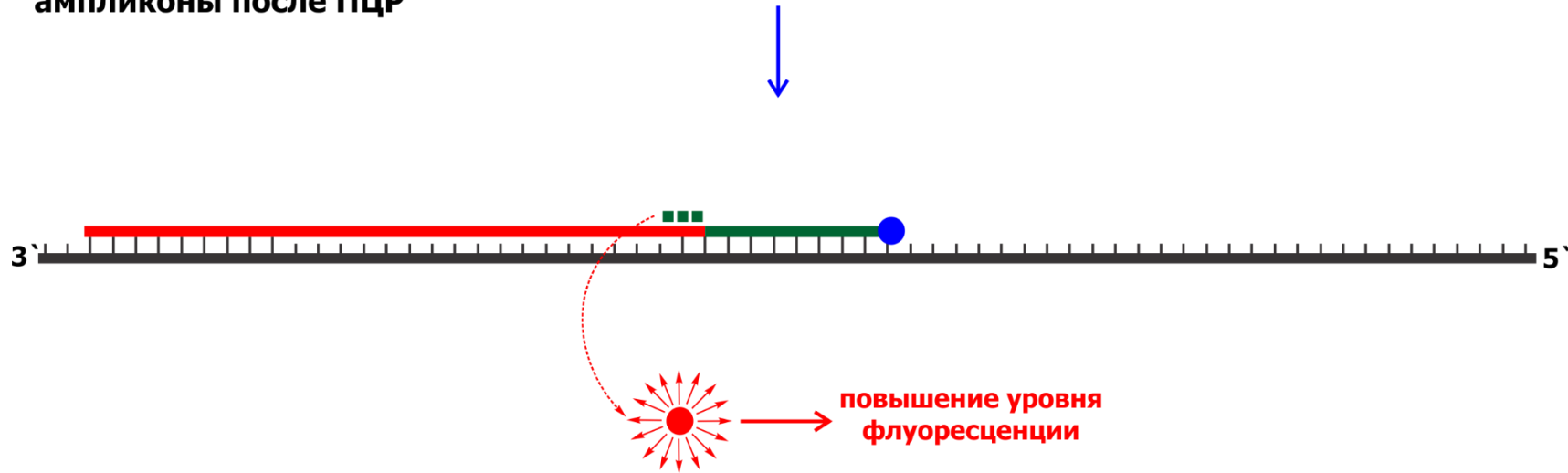
Наиболее распространённые типы красителей и их сочетания:

	Флуорофор	Длина максимального поглощения, нм	Длина максимальной флуоресценции, нм	Совместимый гаситель (длина поглощения; диапазон гашения, нм)
1	6-FAM	494	515	ВНQ-1 (520; 470–570)
2	JOE	520	548	
3	HEX	535	555	
4	TAMRA	555	576	ВНQ-2 (575; 550–650)
5	ROX	573	602	
6	Cy5	651	674	ВНQ-3 (670; 620–730)

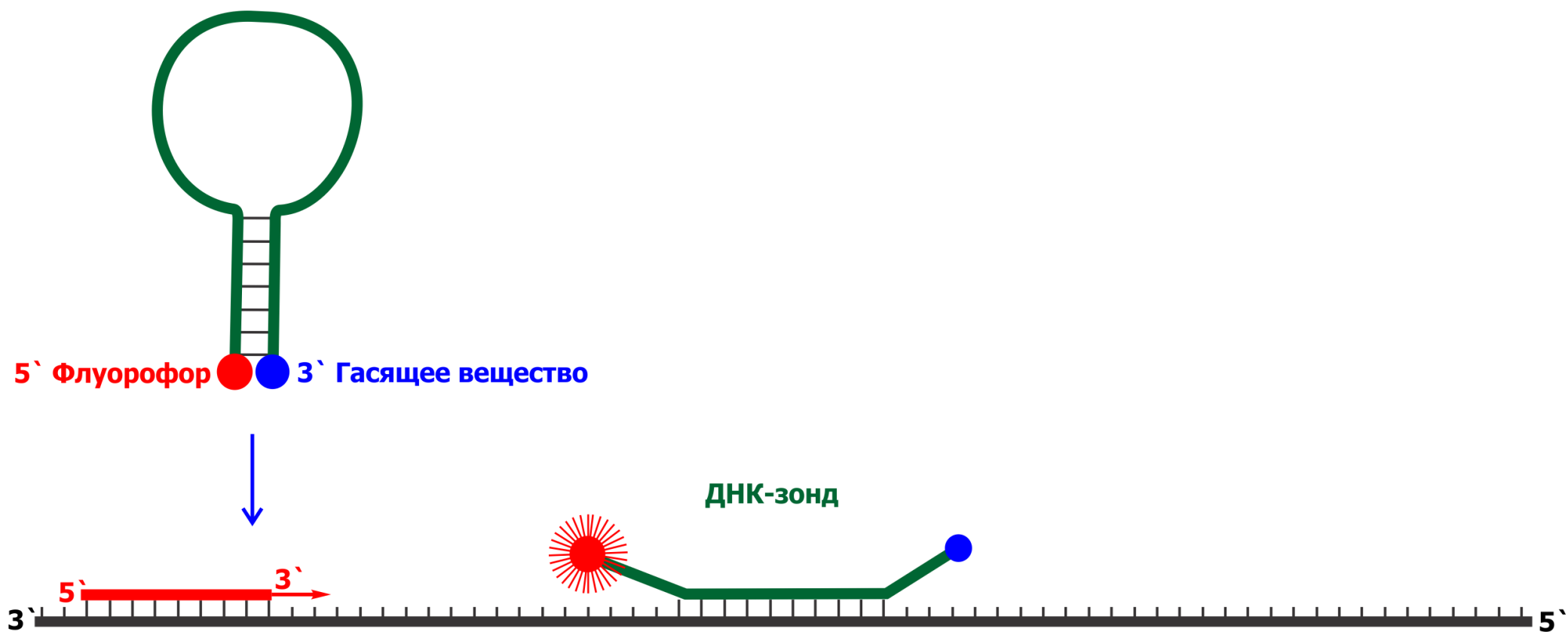
Гибридизация ДНК – образование комплекса комплементарных нуклеиновых кислот в одну молекулу *in vitro*.

ТaqMan-зонды

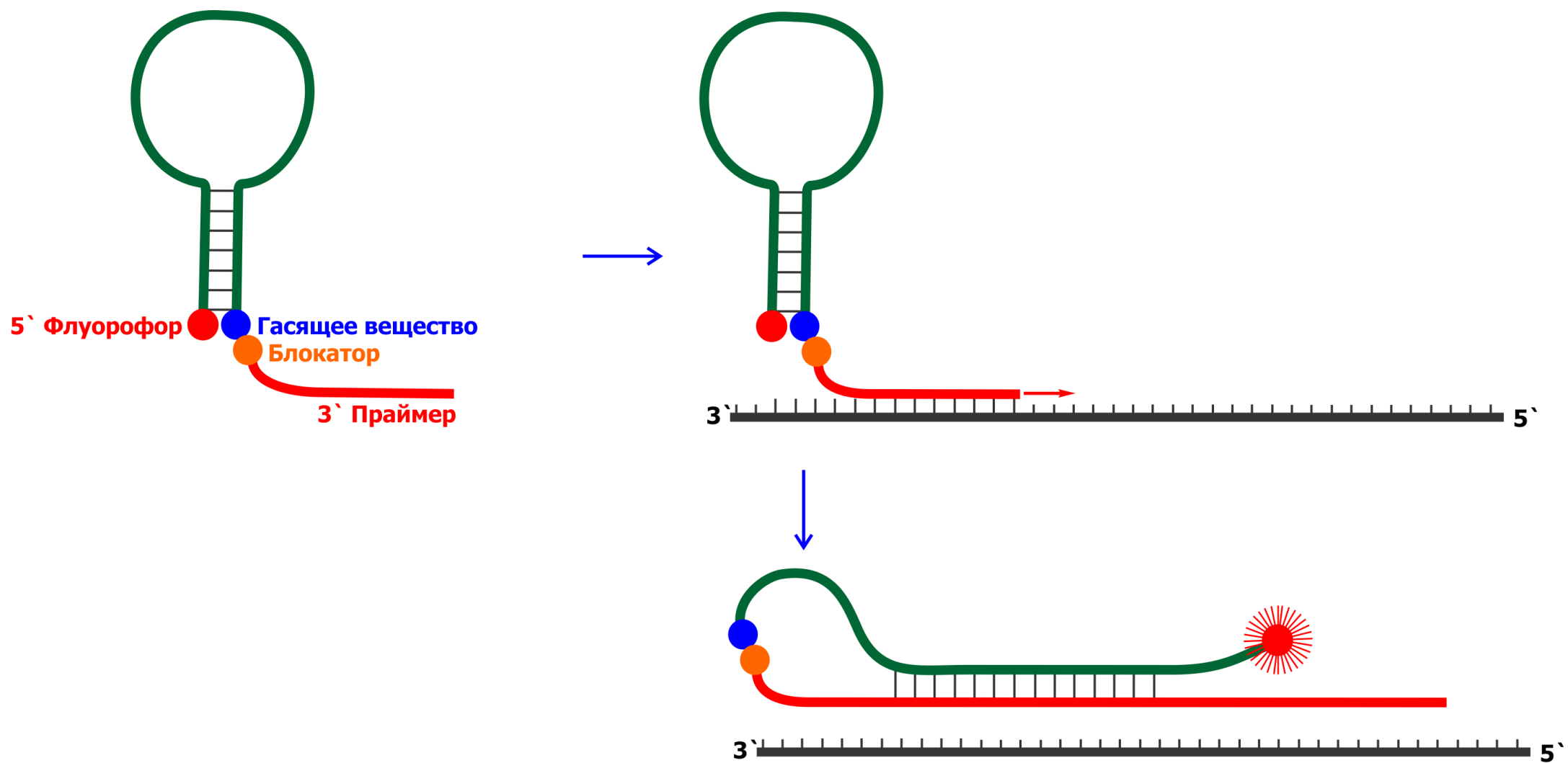
Общая схема гибридизации ампликонов



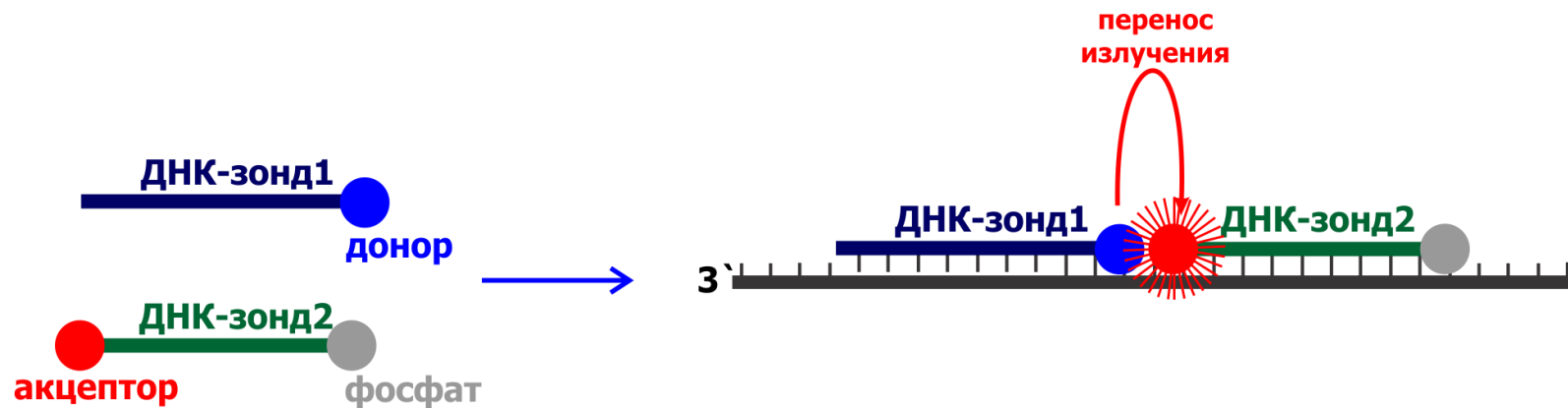
«Молекулярные маяки»



Зонд Scorpions©

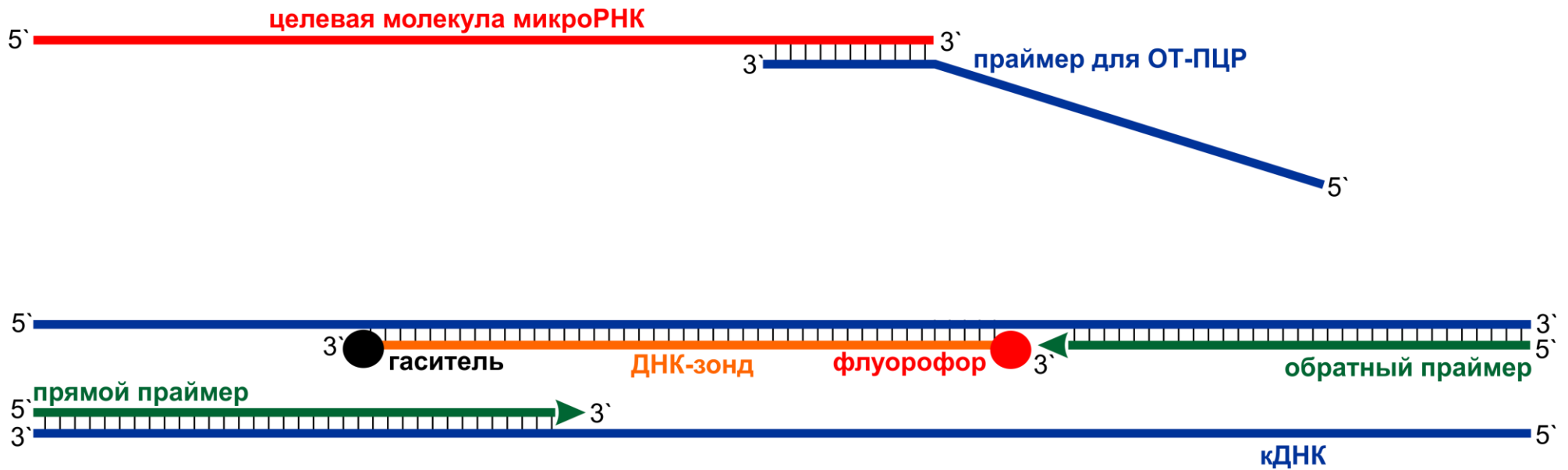


ДНК-зонды, технология FRET

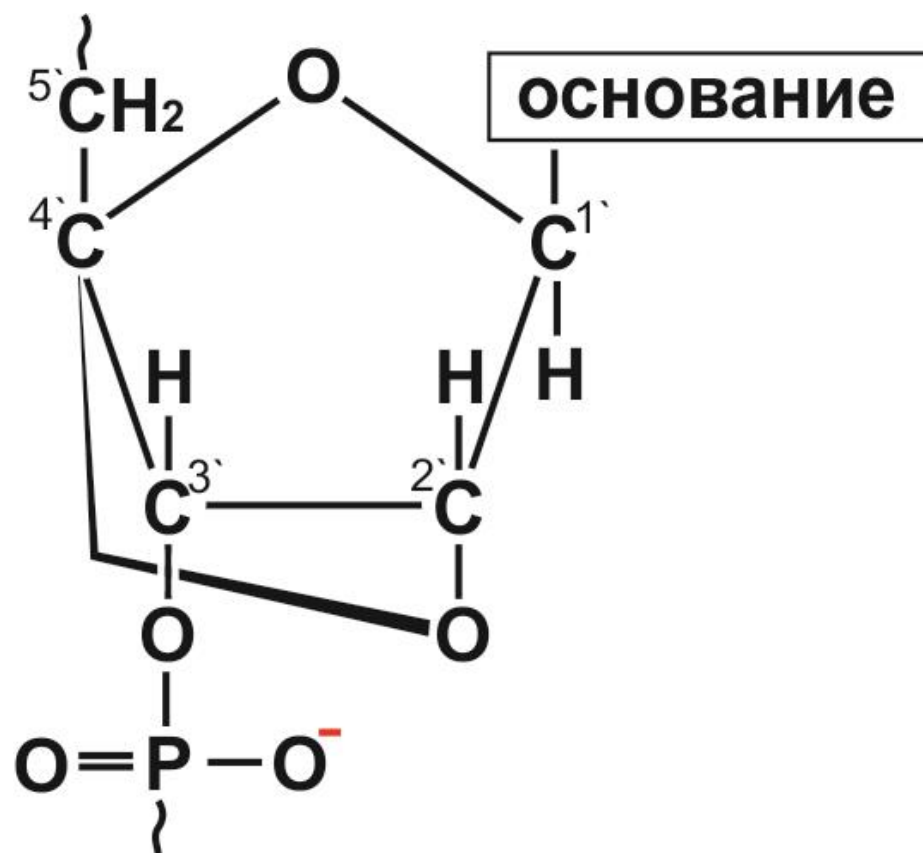


Зонд 1, 3`-конец	Флуоресцеин
Зонд 2, 5`-конец	Флуорофор – LightCycler Red 61, 670, 705
Зонд 2, 3`-конец	Фосфат

Детекция молекул микроРНК с помощью ДНК-зондов



LNA (Locked Nucleic Acid)

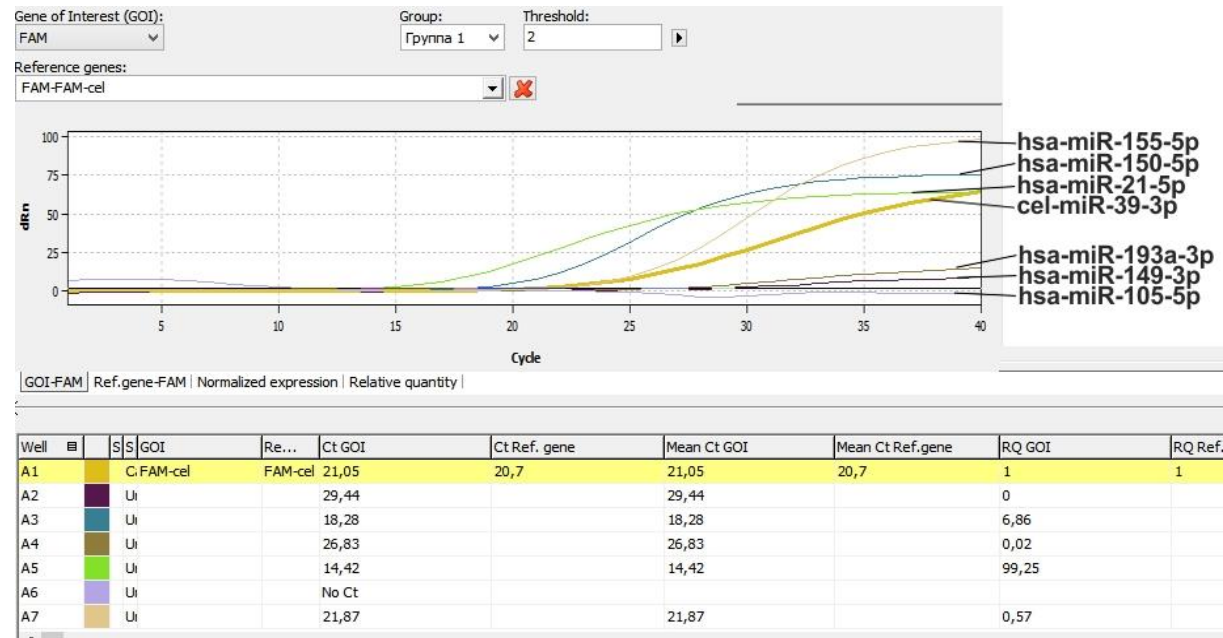
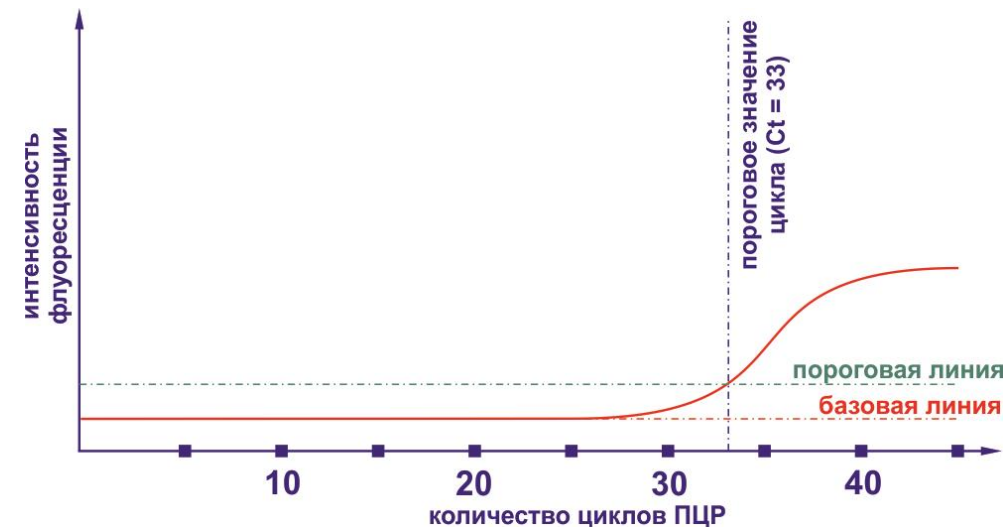


Количественная ПЦР

Расчет относительного уровня по методу $\Delta\Delta Ct$ (Livak, Schmittgen, 2001):

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-((\Delta Ct_{\text{меланома}} - \Delta Ct_{\text{контроль в мел.)}) - (\Delta Ct_{\text{здор.}} - \Delta Ct_{\text{контроль в здор.}))}$$

Необходимость нормализации данных!



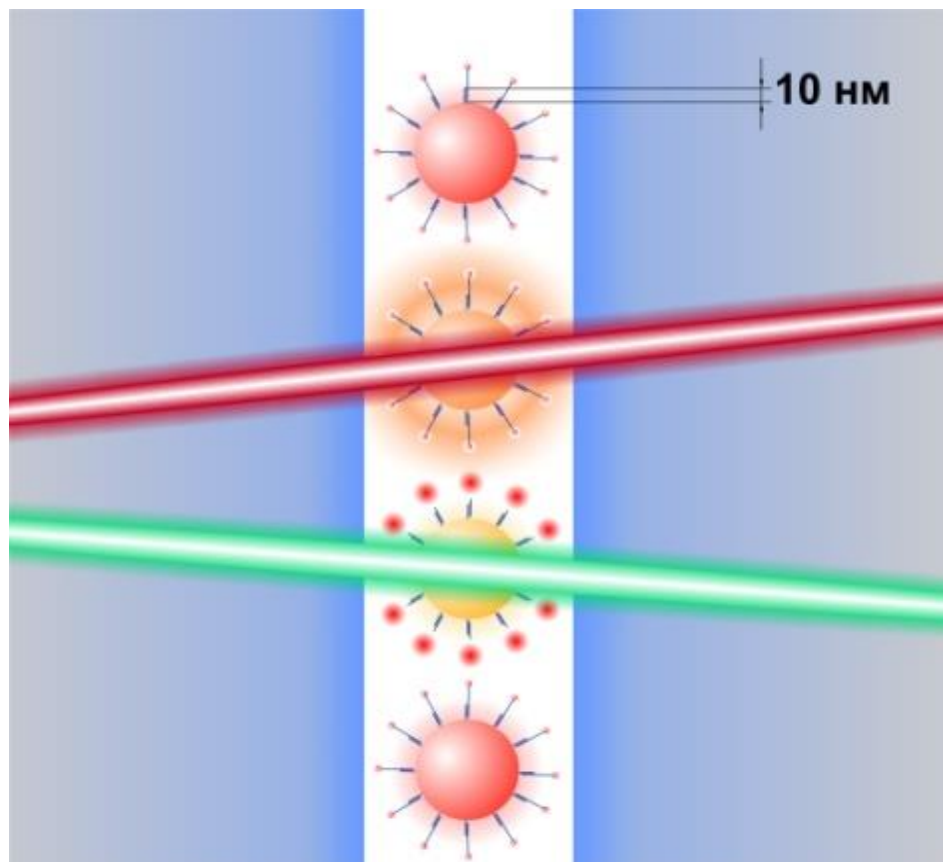
	SYBR® Green I	Дважды меченные зонды	Дважды меченные LNA® зонды	Молеку- лярные маяки	ДНК-зонды, технология FRET	Зонд Scorpions®
Массовый скрининг	++					
Валидация данных микрочипов	++	+				
Несколько целевых генов	+	+				
Выявление SNP			++	+	+	++
Дискриминация аллелей			++	+	+	++
Детекция патогенов	+	+	++	+	+	++
Мультиплексность		++	++	++	+	++
Определение вирусной нагрузки		+	++	+	+	++
Анализ генной экспрессии		+	++	++	++	++
Определение копийности генов		+	++	+	+	++

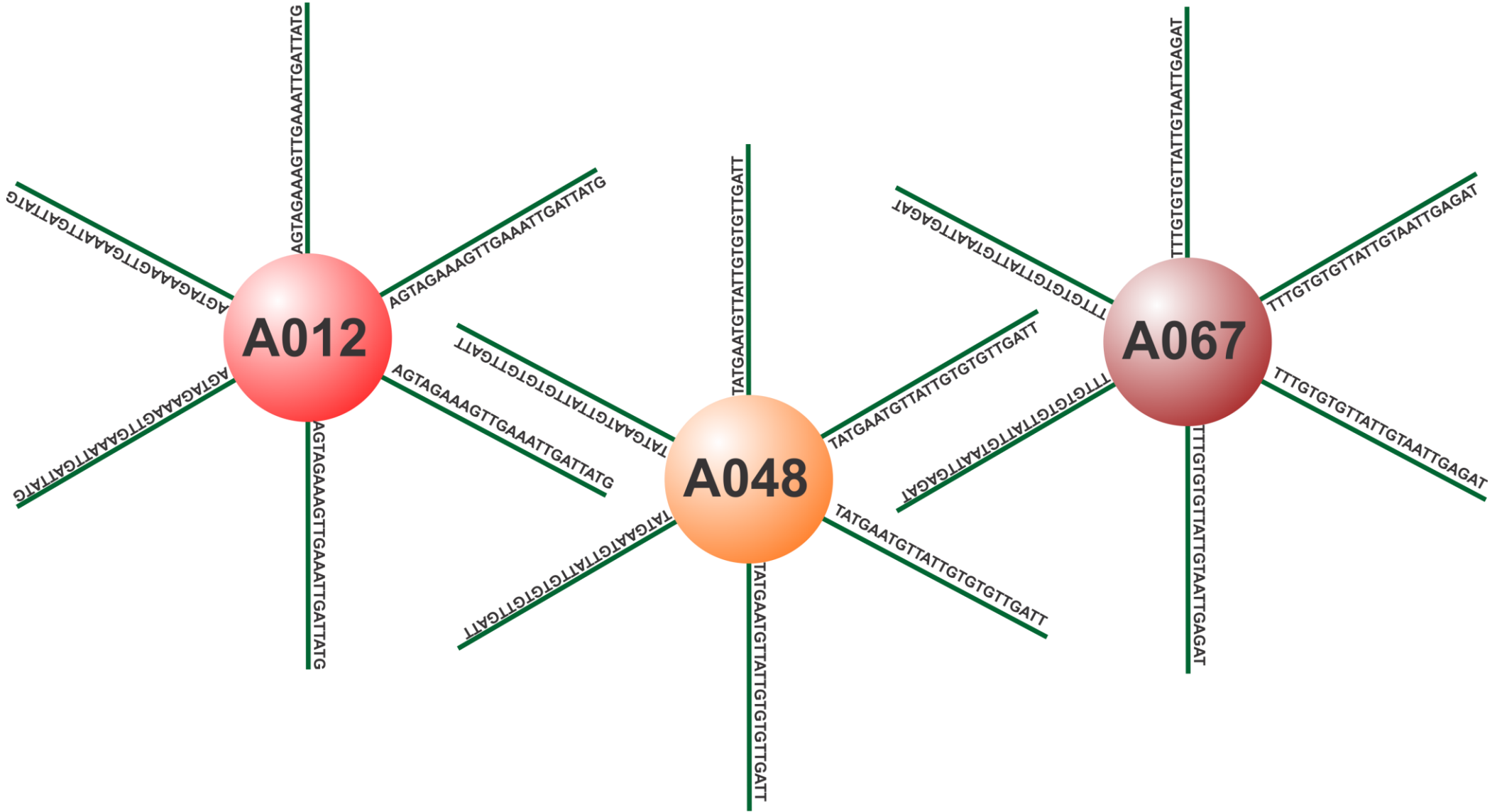


НАНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДХОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ МЕЛАНОМЫ

ТЕХНОЛОГИЯ xMAP

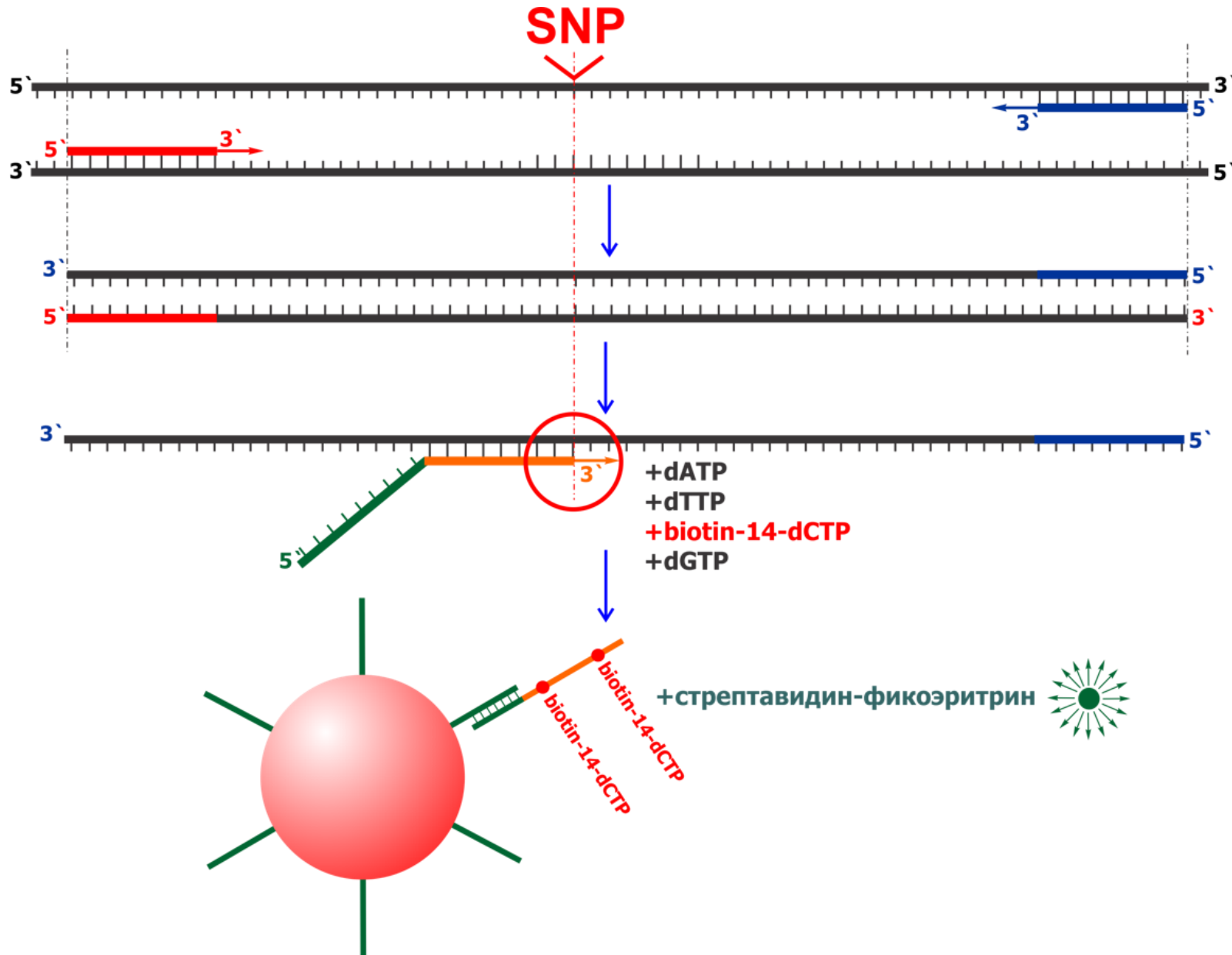
Технология xMAP – это метод мультиплексного анализа, основанный на проточной флуориметрии, с использованием микросфер из полистирола, маркированных красными и инфракрасными флуорофорами (то есть имеющими свою «спектральную подпись»), лазерной детекции, цифровой обработки сигнала и традиционной химии.



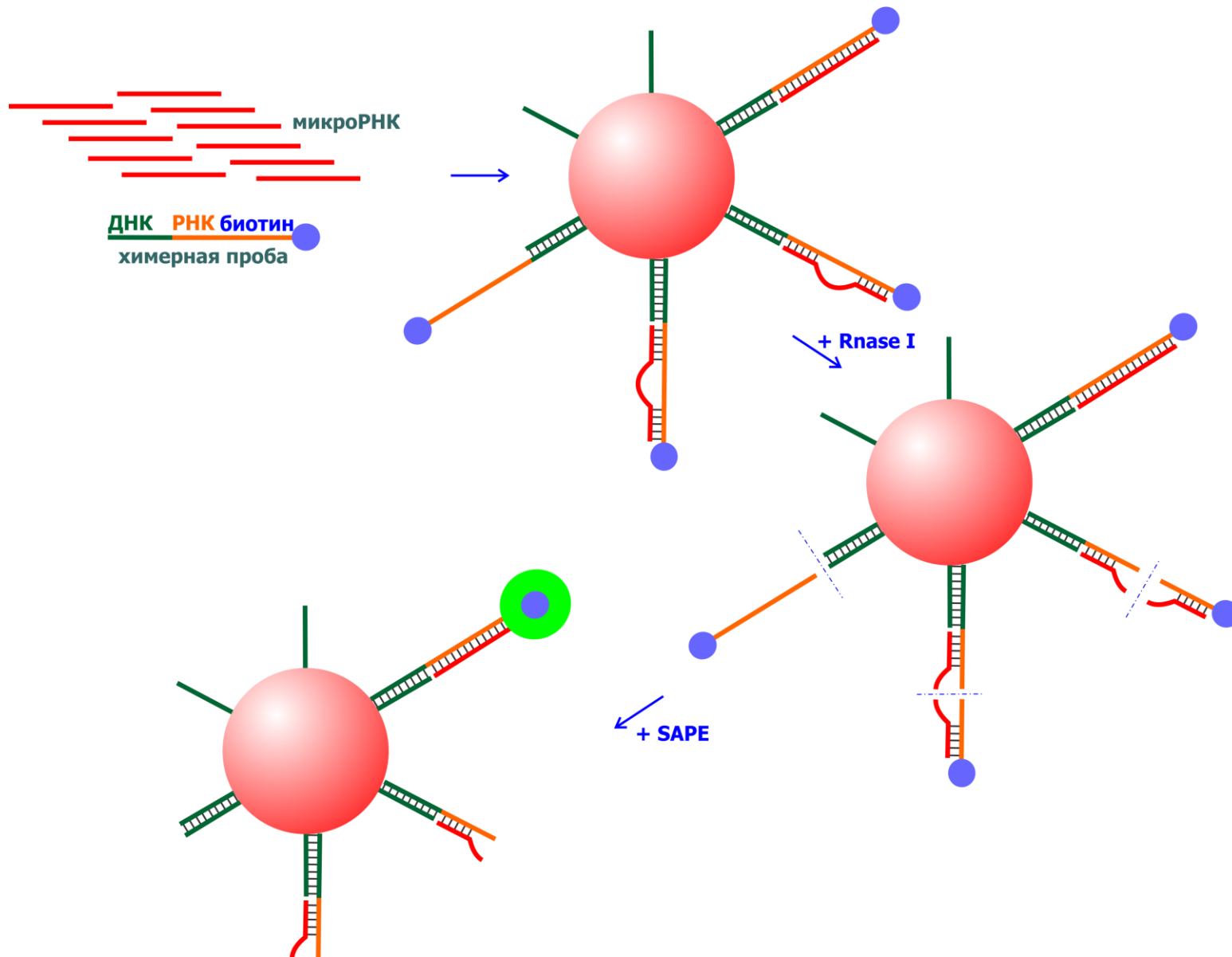


Подходы для детекции молекулярно-генетических маркеров:

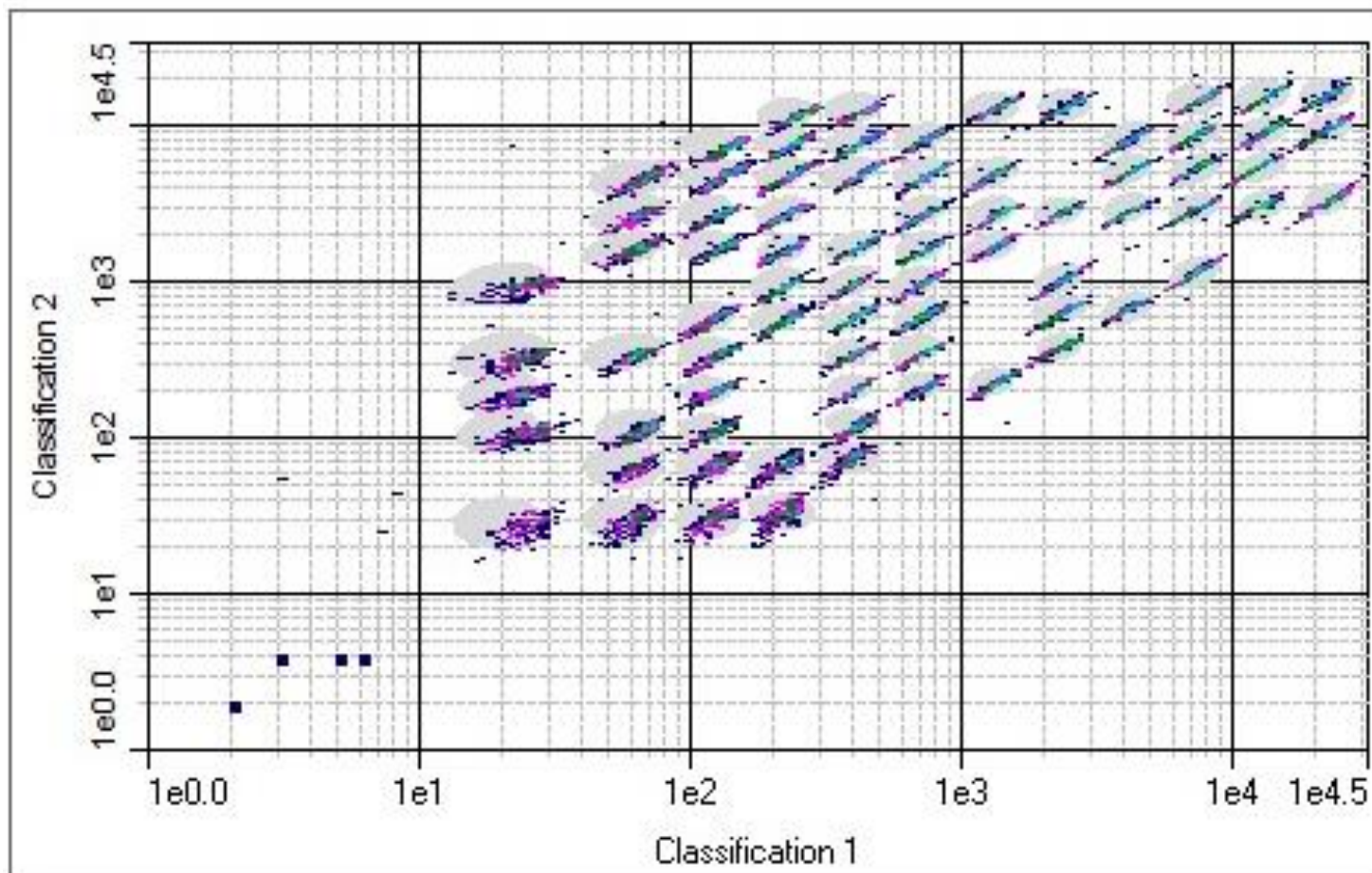
- лигирование олигонуклеотидов (Oligo Ligation Assay, OLA) (SNP);
- аллель-специфичная элонгация праймеров (Allele-Specific Primer Extension, ASPE) (SNP);
- детекция целевой последовательности ДНК;
- прямая ДНК-гибридизация для детекции последовательности;
- анализ профиля микроРНК.



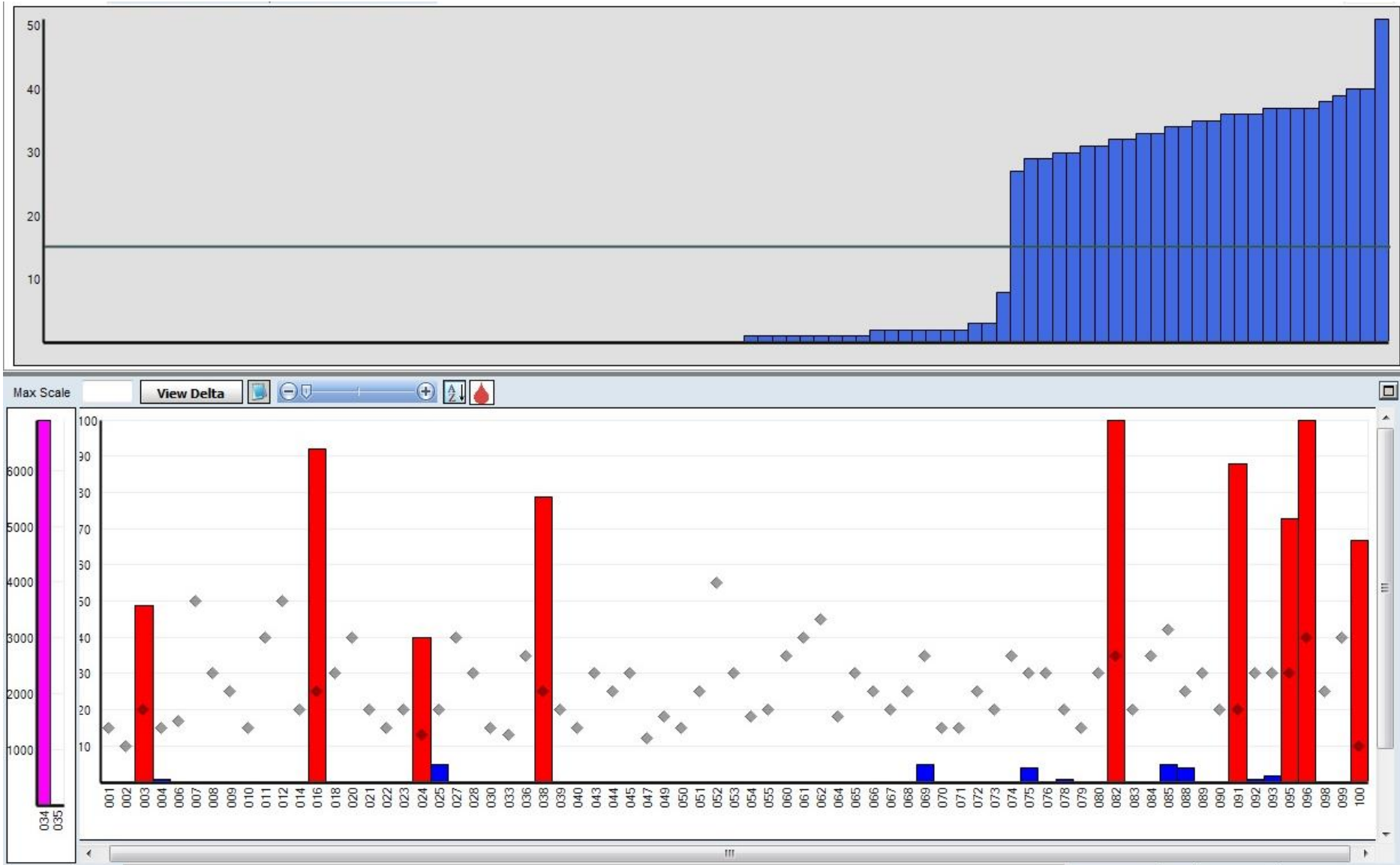
Анализ профиля микроРНК



Интерпретация



Интерпретация





eНано

ЭЛЕКТРОННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
ДЛЯ НАНОИНДУСТРИИ

Спасибо за внимание!

-  117036, г. Москва, проспект
60-летия Октября, 10А,
-  Тел.: +7 495 988 53 88
-  E-mail: info@edunano.ru
-  www.edunano.ru



eНано

ЭЛЕКТРОННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
ДЛЯ НАНОИНДУСТРИИ

Спасибо за внимание!

Ближайшие мероприятия:
23 октября в 19:00 мск

Вебинар: современные технологии в музее

Определенов Владимир Викторович,
заместитель директора ГМИИ им. А.С.Пушкина по
информационным технологиям,
заведующий кафедрой ИТ в сфере культуры НИУ ВШЭ

сайт: edunano.ru

вопросы: enano@rusnano.com