ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТІ
МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА КАФЕДРАСЫ

Пән атауы: Геномика және молекулалық диагностика

Дәріс 10

Молекулалық диагностиканың клиникалық диагностикадан айырмашылығы, биологиялық материалдар.
Молекулалық маркерлер.

Лектор: б.ғ.к., Алтыбаева Н.А.

Дәрістің мақсаты: Студенттерге молекулалық диагностиканың заманауи медицинадағы орнын, оның дәстүрлі клиникалық диагностикадан түбегейлі айырмашылықтарын түсіндіру; молекулалық-биологиялық зерттеулерге арналған биологиялық материалдардың түрлерімен және оларды дайындау ерекшеліктерімен таныстыру; сондай-ақ ауруларды ерте анықтаудағы молекулалық маркерлердің жіктелуі мен қолданылу аясын жан-жақты меңгерту.

Оқыту нәтижелері
Дәрісті меңгергеннен кейін магистрант:

1. Молекулалық және клиникалық диагностика ұғымдарының айырмашылықтарын түсіндіре алады.
2. Молекулалық диагностиканың негізгі зерттеу объектілерін сипаттай алады.
3. Молекулалық зерттеулерде қолданылатын биологиялық материалдардың түрлерін ажырата алады.
4. Биологиялық үлгілерді алу, сақтау және тасымалдау талаптарын түсіндіре алады.
5. Генетикалық, транскрипциялық және ақуыздық биомаркерлерді жіктей алады.
6. Молекулалық маркерлердің диагностикалық және болжамдық маңызын бағалай алады.
7. Зертханалық әдістердің аналитикалық сезімталдығы мен ерекшелігін салыстыра алады.

Кіріспе

Заманауи медицина мен биологияда клиникалық (дәстүрлі) диагностика мен молекулалық диагностика бір-бірін толықтыратын, бірақ зерттеу деңгейі, дәлдігі мен әдіснамасы бойынша түбегейлі айырмашылығы бар екі түрлі тәсіл болып табылады.

Клиникалық диагностиканың негізгі мақсаты - ағзадағы физиологиялық немесе патологиялық өзгерістерді, симптоматиканы және орган жүйелерінің қызметін бағалау. Мұнда зерттеу нысаны ретінде науқастың шағымдары, дене температурасы, қан қысымы, жалпы қан және биохимиялық анализдердегі белоктар мен ферменттердің деңгейі, сондай-ақ ағзаның анатомиялық құрылымын көрсететін визуализациялық әдістер (УДЗ, КТ, МРТ) алынады. Клиникалық диагностика аурудың патологиялық көрінісін (фенотипін) тіркейді.

Молекулалық диагностика - аурудың ең бастапқы фундаменталды деңгейіндегі - генетикалық және молекулалық механизмдерін (генотипін) зерттейді. Зерттеу нысаны - нуклеин қышқылдары (ДНҚ, РНҚ), олардың бірізділігі, нуклеотидтік мутациялар, ДНҚ-ның метилденуі сияқты эпигенетикалық белгілер немесе клеткадағы өзгеретін молекулалық маркерлер.

Клиникалық диагностика

Клиникалық диагностика - пациенттің шағымдарына, сыртқы белгілеріне, мүшелер мен тіндердің морфологиялық және физиологиялық өзгерістеріне сүйене отырып диагноз қою жүйесі.

Негізгі нысаны:

- Бүкіл ағза, жеке мүшелер мен физиологиялық жүйелер (жүрек-қантамыр, тыныс алу, жүйке жүйелері).
- Аурудың фенотиптік көрінісі: сыртқы симптомдар (дене қызуы, бөртпе, ентігу, ауырсыну), орган көлемінің немесе тығыздығының өзгеруі.
- Биохимиялық өнімдер: қан сарысуындағы ақуыздар, ферменттер (мысалы, АЛТ, АСТ, тропонин), гормондар мен электролиттер.

Диагностикалық уақыты мен деңгейі

- Ауру тін немесе орган деңгейінде құрылымдық өзгеріске ұшырағанда ғана нәтиже береді.
- Мысалы, онкологияда ісік көзге көрінетін түйінге айналғанда немесе жұқпалы ауруда дене қызуы көтеріліп, қабыну маркерлері (С-реактивті белок, СОЭ) көбейген кезде ғана тіркеледі.

Артықшылықтары

- Жылдам жүргізіледі әрі медициналық мекемелердің көпшілігіне қолжетімді.
- Бүкіл ағзаның ағымдағы функционалдық жағдайын бірден бағалауға мүмкіндік береді (мысалы, жедел инфаркт, соқырішек немесе өкпе қабынуы).

Шектеулері

- Төмен спецификалылық: Көптеген аурулардың симптомдары өте ұқсас (мысалы, вирустық пневмония мен бактериялық инфекцияның бастапқы белгілері бірдей).
- Ерте кезеңде қауқарсыз: Аурудың жасырын (инкубациялық немесе преклиникалық) кезеңінде нақты диагноз қою мүмкін емес.

Молекулалық диагностика

Молекулалық диагностика - аурудың биологиялық себептерін ең тереңдегі субжасушалық деңгейде, яғни нуклеин қышқылдары (ДНҚ, РНҚ) мен олардың өзгерістеріне қарап анықтайтын бағыт.

Негізгі нысаны

- Организмнің генотипі: адамның ядролық және митохондриялық ДНҚ-сы, РНҚ түрлері (мРНҚ, microRNA).
- Инфекциялық қоздырғыштардың (вирустар, бактериялар, саңырауқұлақтар) генетикалық коды.
- Молекулалық өзгерістер: нүктелік мутациялар (SNP), гендік делециялар мен дупликациялар (CNV), хромосомалық транслокациялар, ДНҚ метилденуі (эпигенетика).

Диагностикалық уақыты мен деңгейі

- Преклиникалық (симптомға дейінгі) кезең: Ағзада ешқандай ауру белгісі, ауырсыну немесе қабыну болмаған күннің өзінде гендегі мутацияны немесе вирус бөлшегін таба алады.
- Мысалы, адамның келешекте сүт безі қатерлі ісігіне шалдығу қаупін BRCA1/BRCA2 гендерін тексеру арқылы 20-30 жыл бұрын анықтауға болады.

Артықшылықтары

- Абсолютті сезімталдық пен жоғары спецификалылық: Биоматериалдағы ДНҚ/РНҚ-ның бірнеше көшірмесін немесе гендегі бір нуклеотидтің орнын ауыстырғанын дәл ажыратады.
- Таргетті емдеуді таңдау: Науқасқа жалпы химиотерапия емес, нақты сол мутацияны бұғаттайтын дербес дәрі-дәрмек (мысалы, өкпе рагындағы EGFR тежегіштері) тағайындауға жол ашады.
- Этиологияны нақты анықтау: Микроорганизмнің түрін ғана емес, оның қандай антибиотикке төзімді екенін оның төзімділік гендері бойынша деп басады.

Шектеулері

- Қымбат қондырғыларды, стерильді таза бөлмелерді (ПТР-бокс) және жоғары білікті генетик-мамандарды талап етеді.
- Барлық аурулар тек генетикаға тәуелді емес (көптеген аурулар көпфакторлы болып келеді, оларға сыртқы орта да әсер етеді).

Клиникалық және молекулалық диагностика әдістерінің айырмашылығы

Салыстыру көрсеткіші	Клиникалық диагностика әдістері	Молекулалық диагностика әдістері
Әдістер тізімі	• Физикалық тексеру (пальпация, перкуссия, аускультация) • Жалпы және биохимиялық қан талдаулары • Электрокардиография (ЭКГ) • сәулелік диагностика: Рентген, КТ, МРТ • Ультрадыбыстық зерттеу (УДЗ) • Стандартты гистология және цитология	• Полимеразалық тізбекті реакция (ПТР, qPCR, dPCR) • ДНҚ/РНҚ секвенирлеу (Сэнгер әдісі, NGS) • ДНҚ-микрочиптер (Microarray analysis) • Флуоресцентті *in situ* гибридизация (FISH)

Молекулалық диагностика және клиникалық диагностика: салыстырмалы талдау

Салыстыру көрсеткіші	Клиникалық диагностика әдістері	Молекулалық диагностика әдістері
Зерттеу деңгейі	Органдар, тіндер, жүйелер қызметі және биохимиялық көрсеткіштер (ферменттер, гормондар, белоктар).	Молекулалық және генетикалық деңгей (ДНҚ, РНҚ нуклеотидтік тізбегі, гендер экспрессиясы, мутациялар).
Анықталатын өзгерістер	Морфологиялық және физиологиялық бұзылыстар, макроскопиялық зақымданулар, симптоматика.	Нуклеотидтік ауысулар (SNP), хромосомалық аберрациялар, гендер нуклеотидтерінің өзгеруі, вирустар мен бактериялардың геномы.
Ауруды анықтау кезеңі	Патологияның айқын белгілері мен тін/орган деңгейіндегі өзгерістері байқалғанда.	Аурудың преклиникалық (симптомсыз) сатысында, мутация деңгейінде немесе бейімділік ретінде.
Негізгі артықшылығы	Жылдам, кең таралған, ағзаның жалпы функционалдық күйін толық көрсетеді.	Өте жоғары спецификалылық пен сезімталдық; аурудың түпкі себебін (этиологиясын) нақты табады.
Негізгі шектеуі	Алғашқы кезеңдерде белгісіз болуы мүмкін; әртүрлі ауруларда симптомдар ұқсас келеді.	Жоғары технологиялық жабдықтар мен арнайы реагенттерді, мамандандырылған персоналды талап етеді.
Медицинадағы басты рөлі	Жедел диагноз қою, жалпы симптоматиканы бағалау және стандартты хаттамалармен емдеу.	Персонификацияланған (дербестелген) медицина, таргетті терапия таңдау, тұқым қуалайтын ауруларды болжау.

Молекулалық диагностикадағы биологиялық материалдар

Молекулалық диагностикада талдаудың негізгі нысаны - нуклеин қышқылдары (ДНҚ және РНҚ). Зерттеудің сенімділігі, сезімталдығы мен спецификалылығы үлгінің табиғатына, алыну әдісіне және өңдеу сапасына тікелей байланысты.

Биологиялық материалдардың жіктелуі және сипаттамасы

1. **Перифериялық қан (венозды қан)**

Ең әмбебап және жиі қолданылатын үлгі түрі. Қан бірнеше фракцияға бөлініп зерттеледі:

- Лейкоцитарлық қабат (Buffy coat): Геномдық ДНҚ бөліп алудың негізгі көзі. Адамның конституциялық (тұқым қуалайтын) мутацияларын, хромосомалық патологияларын және гендік полиморфизмдерін (SNP) анықтауда қолданылады.
- Плазма және қан сарысуы:
  - Жүйелі инфекциялардағы қоздырғыштардың (АҚТҚ/ВИЧ, гепатит В және С, цитомегаловирус) вирустық немесе бактериялық ДНҚ/РНҚ жүктемесін бағалау.
  - Тіндерден қанға өткен жасушасыз нуклеин қышқылдарын талдау.

Биологиялық материалдардың жіктелуі және сипаттамасы

2. Тін үлгілері (биоптаттар және операциялық материалдар)

Негізінен онкологиялық ауруларды диагностикалауда, ісіктің соматикалық мутацияларын табуда және патоморфологияда қолданылады:

- **Жаңа мұздатылған тіндер (Fresh-frozen):**
  - Отадан кейін бірден сұйық азотта (-196°C) немесе ультратөмен температурада (-80°C) қатырылады.
  - Молекулалық құрылымы бұзылмаған жоғары сапалы тұтас ДНҚ мен РНҚ көзі болып саналады. NGS (жаңа буын секвенирлеуі) және транскриптомдық зерттеулер (RNA-seq) үшін алтын стандарт.
- **FFPE-үлгілер (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded):**
  - Тінді формалинде бекітіп, парафинге құю арқылы жасалатын архивтік блоктар.
  - Бұл әдісте формалин ДНҚ/РНҚ молекулаларын фрагменттейді және ақуыз-нуклеин байланыстарын (сшивкалар) түзеді. Сондықтан мұндай үлгілерден ДНҚ бөлу үшін арнайы депарафинизация және ұзартылған протеиназалық өңдеу қажет.

Биологиялық материалдардың жіктелуі және сипаттамасы

3. Сұйық биопсия (Liquid Biopsy) үлгілері

Ағзаға тікелей тін кесусіз (инвазивті емес немесе аз инвазивті) ақпарат алуға мүмкіндік беретін үлгілер:

- **Жасушасыз ДНҚ (cfDNA - cell-free DNA):**
  - ctDNA (циркуляцияланатын ісік ДНҚ-сы): Қатерлі ісік жасушаларының апоптозы мен некрозынан қанға бөлінетін қысқа ДНҚ фрагменттері (шамамен 140-170 н.ж.). Ісіктің мутацияларын сұйық биопсия арқылы бақылауға мүмкіндік береді.
  - cffDNA (ұрықтың жасушасыз ДНҚ-сы): Жүктілік кезінде ана қанында айналып жүретін плацентарлық ДНҚ. Инвазивті емес пренаталдық скринингте (NIPT) анеуплоидияларды (Даун, Эдвардс, Патау синдромдары) ерте мерзімде анықтауға қолданылады.
- **Сілекей және буккальды эпителий (жақтың ішкі сілемейлі қырындысы):**
  - Ауырсынусыз, инвазивті емес жолмен алынады. Тұқым қуалайтын генетикалық ауруларға скрининг, спорттық генетика, фармакогенетикалық тестілеу және сот-медициналық сараптамада геномдық ДНҚ алу үшін қолданылады.

Биологиялық материалдардың жіктелуі және сипаттамасы

4. Пренаталдық диагностиканың инвазивті материалдары

Ұрықтың кариотипін және моногенді ауруларын туылғанға дейін тексеру үшін қолданылатын

- үлгілер: Хорион бүрлері (CVS): Жүктіліктің 10–12 апталығында алынады.
- Амниотикалық сұйықтық (амниоцентез): Жүктіліктің 15–20 апталығында алынатын қағанақ суы. Ішіндегі ұрықтың қабыршақтанған жасушаларынан (амниоциттер) ДНҚ бөлінеді.
- Кіндік қаны (кордоцентез): Жүктіліктің 20-аптасынан кейін күрделі генетикалық жағдайларды нақтылау үшін алынады.

5. Локальды бөлінділер мен секреттер

- Урогенитальды қырындылар мен жағындылар: Несеп-жыныс жүйесінің эпителий жасушалары. Жыныстық жолмен берілетін инфекцияларды (хламидиоз, микоплазмоз, уреаплазмоз) және адам папиллома вирусын (HPV) ПТР әдісімен табуға қолданылады.
- Тыныс алу жолдарының үлгілері (мұрын-жұтқыншақ жағындысы, қақырық, бронхоальвеолярлы лаваж): Респираторлық вирустар (SARS-CoV-2, тұмау) мен бактериялық инфекцияларды (мысалы, туберкулез қоздырғышы - Mycobacterium tuberculosis) молекулалық сәйкестендірудің негізгі нысаны.
- Жұлын сұйықтығы (ликвор): Орталық жүйке жүйесінің жедел немесе созылмалы қабынуларында нейроинфекциялардың (менингококк, энтеровирустар, герпесвирустар) генетикалық маркерлерін табуға арналған.

Преаналитикалық талаптар мен сақтау ережелері

Биоматериал	Контейнер / Антикоагулянт	Сақтау және тасымалдау режимі	Негізгі преаналитикалық қауіп
Қан (ДНҚ үшін)	K2/K3 EDTA (күлгін қақпақ)	+2...+8°C (48 сағатқа дейін); ұзақ сақтау:-20°C немесе -80 °C	Гепаринді қолдану (Taq-полимераза ингибиторы); үлгінің ұюы
Қан (cfDNA үшін)	Арнайы стабилизаторлы пробирка (Streck, BCT)	+15...+25 °C (бөлме температурасы, 7-14 күн)	Қанды мұздатуға болмайды; лейкоциттер лизисі нәтижесінде геномдық ДНҚ-ның араласып кетуі
Тін (РНҚ үшін)	Құрғақ криопробирка немесе RNA-консервант	Сұйық азот (–196°C) немесе –80 °C	РНКаза (RNase) ферменттерінің белсенділігі салдарынан РНҚ-ның жылдам ыдырауы
Тін (FFPE)	10% бейтарап буферленген формалин	Бөлме температурасы	Формалинде 24 сағаттан артық ұстау (артық фиксация ДНҚ деградациясын күшейтеді)
Жағындылар/ Қырындылар	Стерильді тасымалдау ортасы (эппендорф)	+2...+8 °C (24 сағатқа дейін); қатыру: –20 °C	Материалдың жеткіліксіз алынуы немесе сыртқы ДНҚ-мен ластануы (контаминация)

Молекулалық маркерлер: жіктелуі, сипаттамасы және клиникалық маңызы

Молекулалық маркер (биомаркер) - жасушаның, тіннің немесе бүкіл организмнің қалыпты физиологиялық күйін, патологиялық өзгерістерін немесе тағайындалған терапияға беретін жауабын молекулалық деңгейде көрсететін, сандық әрі сапалық тұрғыдан өлшенетін биологиялық көрсеткіш (ДНҚ бірізділігі, РНҚ экспрессиясы, эпигенетикалық өзгеріс немесе спецификалық белок). Молекулалық маркерлер биохимиялық құрылымы мен зерттелу деңгейіне қарай төрт негізгі топқа бөлінеді:

А. Генетикалық маркерлер (ДНҚ деңгейі)

Генетикалық маркерлер бастапқы нуклеотидтер тізбегіндегі тұқым қуалайтын немесе жүре пайда болған өзгерістерді сипаттайды:

- ***SNP (Sinoftle Nucleotide Polymorphism - бір нуклеотидті полиморфизм):*** Геномдағы бір нуклеотидтің (A, T, G, C) басқа нуклеотидке ауысуы. Геномда ең жиі кездесетін вариация түрі. Мультифакторлы ауруларға бейімділікті (диабет, гипертония) және жекелеген дәрілік заттардың метаболизмін зерттеуде басты рөл атқарады.
- ***STR / Микросателлиттер (Short Tandem Repeats):*** 2-6 нуклеотидтен тұратын қайталанатын қысқа тізбектер. ДНҚ-паспорттауда, сот-сараптамалық сәйкестендіруде, ұрықтың ата-аналық қатынасын тексеруде және ісіктердегі микросателлитті тұрақсыздықты (MSI) бағалауда алтын стандарт саналады.
- ***CNV (Copy Number Variation - көшірмелер санының вариациясы):*** Геномдағы үлкен сегменттердің (1 мыңнан миллиондаған жұп нуклеотидтерге дейін) қосарлануы (дупликация) немесе өшірілуі (делеция). Онкологияда кең таралған, мысалы, сүт безі қатерлі ісігіндегі HER2/neu генінің көшірмелерінің көбеюі (амплификация).
- ***Хромосомалық транслокациялар мен химерлі гендер:*** Хромосома бөліктерінің өзара ауысуынан пайда болатын жаңа функционалды гендер (мысалы, t(9;22) Филадельфия хромосомасы нәтижесінде түзілетін BCR-ABL1 біріккен гені).

Молекулалық маркерлер: жіктелуі, сипаттамасы және клиникалық маңызы

Б. Эпигенетикалық маркерлер

ДНҚ-ның алғашқы нуклеотидтік бірізділігін өзгертпестен, гендердің экспрессиялық белсенділігін өзгертетін құрылымдық белгілер:

- ДНҚ метилденуі (DNA Methylation): Көбінесе CpG-динуклеотидтер шоғырланған промоторлық аймақтағы цитозинге метил тобының қосылуы. Промотордың гиперметилденуі геннің «үндемеуіне» (клетканың ісікке қарсы супрессорлық қорғанысының сөнуіне) алып келеді (мысалы, MLH1, BRCA1 гендерінің метилденуі).
- Гистондардың ковалентті модификациясы: Гистон белоктарының ацетилденуі, метилденуі немесе фосфорлануы арқылы хроматин тығыздығын (эухроматин/гетерохроматин) өзгертіп, транскрипция қарқынын реттеуі.

В. Экспрессиялық немесе транскриптомдық маркерлер (РНҚ деңгейі)

- мРНҚ (матрицалық РНҚ) экспрессиялық профилі: Жасушадағы белгілі бір гендер белсенділігінің сандық көрсеткіші. Мысалы, ісіктердің молекулалық кіші түрлерін (molecular subtypes) ажырату үшін қолданылатын мультигендік панельдер (Oncotype DX, MammaPrint).
- Шағын кодтамайтын РНҚ-лар (microRNA, lncRNA): Жасушааралық байланысқа және трансляцияны тежеуге қатысатын қысқа тізбектер (18-24 нуклеотид). МикроРНҚ-лар биологиялық сұйықтықтарда (қан сарысуы, сілекей) экзосома құрамында аса тұрақты сақталатындықтан, сұйық биопсияның ерте индикаторлары болып табылады.

Молекулалық маркерлер: жіктелуі, сипаттамасы және клиникалық маңызы

Г. Протеомикалық маркерлер (Белок деңгейі)

Патология кезінде синтезделетін немесе деңгейі шұғыл өзгеретін ерекше ақуыздар мен пептидтер (мысалы, онкологиялық қан маркерлері: PSA - простата-спецификалық антиген, CA-125, CEA, альфа-фетопротеин).

Клиникалық маңызы

Молекулалық маркерлер медицинаны «аурудың сыртқы белгілерін басу» деңгейінен «патологияның бастапқы молекулалық механизімін түзетуге» өткізді. Олардың көмегімен:

1. Аурулар алғашқы симптомдарына дейін ерте анықталады (превентивті скрининг).
2. Әр науқастың жеке геномына сай тиімділігі жоғары және жанама әсері аз таргетті препараттар таңдалады (дербестелген онкология).
3. Инвазивті қайталанбалы биопсиялардың орнына қарапайым қан үлгісі арқылы терапияның барысын онлайн бақылауға мүмкіндік туды.

Молекулалық маркерлерді анықтаудың негізгі әдістері

Маркер деңгейі	Маркер мысалы	Негізгі анықтау әдісі	Клиникалық қолданылуы
ДНҚ (нүктелік мутация)	*BRAF V600E*, *KRAS G12D*	Нақты уақыт режиміндегі ПТР (qPCR), dPCR, Sanger	Меланома, тоқ ішек рагында таргетті ем таңдау
ДНҚ (кең ауқымды өзгеріс)	Мутациялық профиль, CNV	Жаңа буын секвенирлеуі (NGS panel, WES)	Кешенді онкогенетикалық профильдеу
Хромосомалық аномалия	t(9;22), HER2 амплификациясы	FISH (флуоресцентті гибридизация), кариотиптеу	Лейкоздар, сүт безі обыры
Эпигенетика	*MGMT*, *Septin9* метилденуі	Метилспецификалық ПТР (MSP), бисульфитті секвенирлеу	Нейроонкология, колоректальды қатерлі ісік скринингі
РНҚ (экспрессия)	BCR-ABL1 транскрипті, microRNA	Кері транскрипциялы ПТР (RT-qPCR), RNA-seq	Емдеу мониторингі, ісік кіші түрлерін анықтау

ҚОРЫТЫНДЫ

Молекулалық диагностика ауруларды дәстүрлі клиникалық тәсілдер сияқты орган немесе симптом деңгейінде емес, бастапқы субжасушалық деңгейде - нуклеин қышқылдарындағы (ДНҚ, РНҚ) генетикалық өзгерістер арқылы әлі клиникалық белгілер басталмай тұрып-ақ аса жоғары сезімталдықпен анықтауға мүмкіндік береді; бұл зерттеулердің сәттілігі қаннан бастап тін биоптаттары мен жасушасыз ДНҚ-ға (cfDNA) дейінгі биологиялық материалдарды преаналитикалық кезеңде сапалы дайындауға тікелей байланысты болса, анықталған молекулалық маркерлер (мутациялар, экспрессиялық және эпигенетикалық өзгерістер) дертті нақты растап қана қоймай, оның ағымын болжауға, рецидивті қадағалауға және әр науқасқа жеке таргетті ем таңдау арқылы дербестелген медицинаны жүзеге асыруға негіз болады.