

Диагностическая и прогностическая значимость экспрессии онкогенов в опухолях и слизистой оболочке желудка человека

В.П. Калиновский¹, Л.Б. Новиков¹, Ю.А. Лимарева², Л.С. Орешко²

¹Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург;

²Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова

Одним из достижений молекулярной медицины последних лет стало выявление генов-онкогенов, нарушение экспрессии которых лежит в основе злокачественной трансформации [1, 2]. Для изучения степени радикальности хирургического лечения больных раком желудка был применен молекулярно-генетический подход. С этой целью изучена экспрессия протоонкогенов *c-Myc*, *N-Myc*, *Ha-Ras*, *Ki-Ras* и *c-Raf* в опухолях желудка и слизистой оболочке, взятой по краю резекции органа у 27 больных раком желудка. Контролем корректности использования примененного подхода к анализу степени радикальности хирургического лечения онкологических больных послужило молекулярно-генетическое обследование трех больных хронической язвой желудка, поступивших на лечение с подозрением на малигнизацию. У больных язвой желудка экспрессия указанных протоонкогенов была изучена в клетках слизистой, взятой вблизи язвенного дефекта и по краю резекции органа.

Материал и методика

Материалом для исследования служили образцы карцином и слизистой оболочки желудка, взятой по краю резекции органа и около хронической язвы желудка больных, находящихся на лечении в стационаре НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова МЗ РФ. Диагноз каждого больного верифицировался на основании данных фиброгастроскопии и гистологического исследования биопсийного материала и препарата, удаленного во время операции. Всего анализировано 30 больных.

Методы анализа: фенол/детергентный метод выделения РНК и ДНК из клеток человека, спектрофотометрический анализ нуклеиновых кислот, электрофорез, дот- и нозерн-блоты РНК, радиоактивное мечение ДНК-зондов, ДНК-РНК-гибридизация на фильтрах, автордиография и денсиметрия, как описано ранее [3, 4].

ДНК-зонды, использованные в реакции гибридизации, накапливали в бактериях кишечной палочки (штамма HB 101), трансформированной плазмидами pV-Myc, pV-Fos, pNB I (n-Myc), pEJ 6.6 (c-Ha-Ras I), pHi-Hi3 (pv-Ki-Ras), prB2 (c-Raf1).

Выделение плазмид из бактерий вели методом щелочного лизиса [5]. Плазмидную ДНК идентифицировали с паспортными данными методом рестрикционного анализа и электрофореза [4].

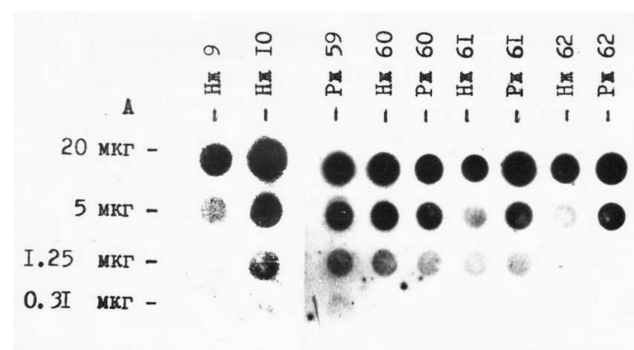


Рис. 1. Экспрессия протоонкогена *c-Myc* в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека. Гибридизация в пятне препаратов тотальной клеточной РНК с пробой pY-Myc. Здесь и на рис. 2 и 3: слева – количество РНК (в мкг), содержащейся в каждом разведении; Н – норма, Р – рак, цифры – номера историй болезней.

Результат исследования

На рис. 1 представлены результаты определения уровня экспрессии протоонкогена *c-Myc* в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека. В большинстве случаев сигнал радиоактивности в дотах усиливался в опухоли в 4 раза, но в некоторых случаях усиление сигнала отмечается и в неизменной слизистой оболочке желудка больных людей.

Аналогичная картина наблюдалась при исследовании экспрессии протоонкогена *c-Fos* (рис. 2). Усиление экспрессии протоонкогена *Ha-Ras* I в карциномах желудка исследованных больных наблюдалось значительно реже, чем *c-Myc* и *c-Fos*. При этом увеличение накопления транскриптов, достигающее 4- и 8-кратного уровня в случае *Ha-Ras* 1, выявилось только в карциноме и ее метастазе и не обнаружилось в прилегающей слизистой оболочке.

Особенностью активации экспрессии *Ha-Ras* 1 является то, что она может наблюдаться в первичной опухоли (рис. 3, P35), усиливаться в метастазе (см. рис. 3, Mр35) или появляется впервые только в метастатическом опухолевом узле (см. рис. 3, Mр51).

Количественную оценку транскрипционной активности протоонкогенов вели методом дот-анализа эффективности гибридизации препаратов тотальной клеточной РНК с соответствующими меченными 32P-ДНК-зондами. Усиление сигнала в 3–4 раза свидетельствовало об обогащении препаратов тотальной клеточной РНК молекулами специфической и РНК в такое же число раз и указывало на повышенную экспрессию гена. Методом дот-анализа установлено, что усиление экспрессии протоонкогенов наблюдалось в 18 опухолях желудка человека из 23 (78,3%). У 8 из 27 (29,6%) больных раком желудка выявлено усиление экспрессии протоонкогенов в морфологически неизменной слизистой, взятой по краю резекции органа, и ни у одного больного с хронической язвой желудка. Причем повышенная экспрессия *c-Myc* выявлена в 5 случаях из 8 (62,5%), *c-Fos* – в 3 из 8 (37,5%), *N-Myc* – в 1 из 8 (12,5%) и *Ki-Ras* – в 1 из 8 (12,5%), одновременно двух онкогенов в 2 из 8 (25%). Более того, методом нозерн-блот-анализа установлено, что в неизменной слизистой оболочке больных раком желудка изменение экспрессии протоонкогенов может сопровождаться появлением аномального по величине транскрипта, а следовательно, и белка в клетках оставшейся части культи желудка после проведенной хирургической операции. Два таких случая были выявлены при изучении размеров *c-Fos*-специфической и РНК.

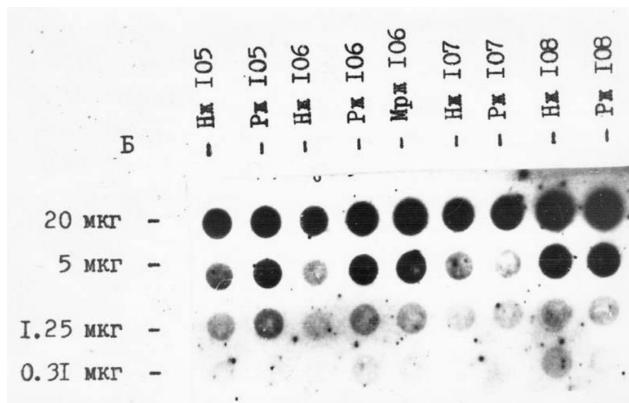


Рис. 2. Экспрессия протоонкогена *c-Fos* в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека. Гибридизация в пятне препаратов тотальной клеточной РНК с пробой *pv-fos*. Нк – метастаз рака желудка.

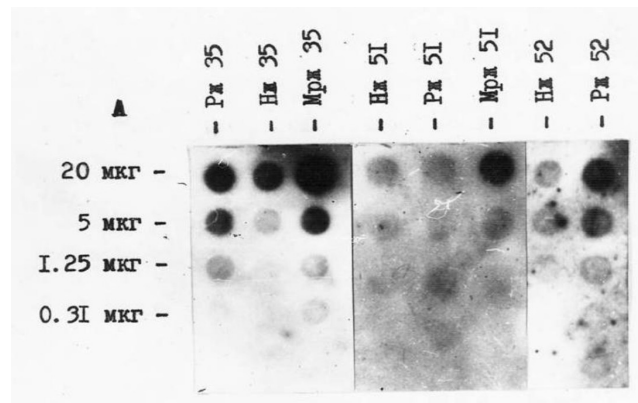


Рис. 3. Экспрессия протоонкогена *c-Ha-ras* в тканях опухоли и слизистой оболочки желудка человека. Гибридизация в пятне препаратов тотальной клеточной РНК с пробой EJ 6.6.

За 3 года наблюдения скончались 5 из 27 (18,5%) больных, перенесших радикальную операцию по поводу рака желудка. У 2 из 5 (40%) скончавшихся в слизистой оболочке оставшейся культи желудка была выявлена измененная экспрессия протоонкогенов.

Выводы

1. Морфологические критерии неизменной слизистой оболочки желудка в 8 из 27 (29,6%) случаев не совпадают с данными молекулярно-генетического анализа, свидетельствующего о том, что в оставшейся после операции слизистой оболочке желудка могут наблюдаться нарушения в транскрипционной активности генов, в том числе и протоонкогенов.

2. Нарушения в экспрессии протоонкогенов могут захватывать поверхность слизистой оболочки желудка человека на значительном расстоянии от самой опухоли, сохраняться в оставшейся после резекции культи желудка и предшествовать морфологической трансформации клеток.

3. Прогноз 5-летней выживаемости значительно хуже для той группы больных, в которой выявлена измененная экспрессия протоонкогенов в слизистой оболочке желудка по краю резекции органа.

4. Молекулярно-генетический анализ экспрессии протоонкогенов может быть использован в оценке эффективности хирургического лечения больных раком желудка.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Имянитов Е.Н., Калиновский В.П., Князев П.Г. и др.* Молекулярная генетика опухолей человека // *Вопр. онкол.* – 1997. – Т. 43, № 1. – С. 95–101.
2. *Калиновский В.П., Приворотский В.Ф., Хансон К.П.* Диагностическая и прогностическая значимость экспрессии тканеспецифических биомаркеров в опухолях и при других патологических состояниях желудка: Метод. реком. – СПб., 2001.
3. *Киселев Ф.Л., Павлиш О.А., Татосян А.Г.* Молекулярные основы канцерогенеза у человека. – М.: Медицина, 1990. – 317 с.
4. *Новиков Л.Б., Калиновский В.П., Князев П.Г. и др.* Экспрессия некоторых протоонкогенов в карциномах желудка человека и в слизистой оболочке желудка крыс при гастроканцерогенезе, индуцированном N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином // *Эксперим. онкология.* – 1989. – Т. 11, № 1. – С. 18–21.
5. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбруг Дж.* Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – С. 193–195.
6. *Успенская М.Н., Калиновский В.П., Ткаченко Е.И. и др.* Инфекция *Helicobacter pylori* в свете современных представлений о гастроканцерогенезе и пепсин-пепсиноген-образующей функции желудка // *Вопр. онкол.* – 2005. – Т. 51, № 5. – С. 533–539.
7. *Успенская М.Н., Калиновский В.П., Ткаченко Е.И.* Биохимические и иммунологические критерии оценки состояния слизистой оболочки желудка при ее опухолевой патологии // *Вопр. онкол.* – 2007. – Т. 53, № 3. – С. 304–310.
8. *Хансон К.П., Калиновский В.П., Новиков Л.Б. и др.* Биохимические молекулярно-генетические аспекты гастроканцерогенеза у человека и животных // *Вопр. мед. химии.* – 1991. – Т. 37, № 6. – С. 84–87.
9. *Шумаков А.Р., Калиновский В.П., Хансон К.П.* Анализ полиморфизма генов пепсиногена А при раке желудка // *Вопр. онкол.* – 1999. – Т. 45, № 2. – С. 129–130.
10. *Шумаков А.Р., Федоров С.Н., Калиновский В.П. и др.* Анализ экспрессии генов пепсиногена А при раке желудка // *Вопр. онкол.* – 1999. – Т. 45, № 3. – С. 238–240.