

10. Junyent M., Cofán M., Núñez I., Gilabert R., Zambón D., Ros E. Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (5): 1107—13.
11. Kaste M., Koivisto P. Risk of brain infarction in familial hypercholesterolemia. *Stroke.* 1988; 19 (9): 1097—100.
12. Mabuchi H., Miyamoto S., Ueda K., Oota M., Takegoshi T., Wakasugi T. et al. Causes of death in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1986; 61 (1): 1—6.
13. Huxley R.R., Hawkins M.H., Humphries S.E., Karpe F, Neil H.A. Risk of fatal stroke in patients with treated familial hypercholesterolemia: a prospective registry study. *Stroke.* 2003; 34 (1): 22—5.
14. Schmitz S.A., O'Regan D.P., Fitzpatrick J., Neuwirth C., Potter E., Tosi I., Hajnal J.V., Naoumova R.P. White matter brain lesions in midlife familial hypercholesterolemic patients at 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Acta Radiol.* 2008; 49 (2): 184—9.
15. Soljanlahti S., Raininko R., Hyttinen L., Lauerma K., Keto P., Vuorio A.F., Autti T. Statin-treated familial hypercholesterolemia patients with coronary heart disease and pronounced atherosclerosis do not have more brain lesions than healthy controls in later middle age. *Acta Radiol.* 2007; 48 (8): 894—9.

REFERENCES

1. Meshkov A.N., Malyshev P.P., Kuharchuk V.V. Familial hypercholesterolemia in Russia: genetic and phenotypic characteristics. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2009; 81 (9): 23—8. (in Russian)
2. Zakharova F.M., Damgaard D., Mandelshtam M.Y., Golubkov V.I., Nissen P.H., Nilsen G.G. et al. Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low density lipoprotein receptor gene in Russia. *BMC Med. Genet.* 2005; 6: 6.
3. Soutar A.K., Naoumova R.P. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2007; 4 (4): 214—25.
4. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register group. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolemia: implications for clinical management. *Atherosclerosis.* 1999; 142: 105—12.
5. Kunkel L.M., Kirby D.R., Boyer S.H., Borgaonkar D.S., Wachtel S.S., Miller O.J. et al. Analyses of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74: 1245—9.
6. Bell G.I., Karam J.H., Rutter W.J. Polymorphic DNA region adjacent to the 5'-end of the human insulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78: 5759—63.
7. Hobbs H.H., Brown M.S., Goldstein J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* 1992; 1 (6): 445—66.
8. Oosterveer D.M., Versmissen J., Yazdanpanah M., Hamza T.H., Sijbrands E.J. Differences in characteristics and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients with and without tendon xanthomas: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2009; 207: 311—7.
9. Artieda M., Cennarro A., Junquera C. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia is associated with a differential inflammatory response of macrophages to oxidized LDL. *FEBS Lett.* 2005; 579: 4503—12.
10. Junyent M., Cofán M., Núñez I., Gilabert R., Zambón D., Ros E. Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (5): 1107—13.
11. Kaste M., Koivisto P. Risk of brain infarction in familial hypercholesterolemia. *Stroke.* 1988; 19 (9): 1097—100.
12. Mabuchi H., Miyamoto S., Ueda K., Oota M., Takegoshi T., Wakasugi T. et al. Causes of death in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1986; 61 (1): 1—6.
13. Huxley R.R., Hawkins M.H., Humphries S.E., Karpe F, Neil H.A. Risk of fatal stroke in patients with treated familial hypercholesterolemia: a prospective registry study. *Stroke.* 2003; 34 (1): 22—5.
14. Schmitz S.A., O'Regan D.P., Fitzpatrick J., Neuwirth C., Potter E., Tosi I., Hajnal J.V., Naoumova R.P. White matter brain lesions in midlife familial hypercholesterolemic patients at 3-Tesla magnetic resonance imaging. *Acta Radiol.* 2008; 49 (2): 184—9.
15. Soljanlahti S., Raininko R., Hyttinen L., Lauerma K., Keto P., Vuorio A.F., Autti T. Statin-treated familial hypercholesterolemia patients with coronary heart disease and pronounced atherosclerosis do not have more brain lesions than healthy controls in later middle age. *Acta Radiol.* 2007; 48 (8): 894—9.

Поступила 21.01.14

Received 21.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616-006.04-07:577.21.086

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА

Плотникова Н.А.¹, Сабиров А.Х.⁴, Мырксин С.А.¹, Сингх Р.Б.², Казани Зулбейр³, Харитонов С.В.¹, Канаев П.М.¹, Албегова Ж.К.⁵

¹ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск; ²Госпиталь им. Халберга и научно-исследовательский институт, Индия; ³Республика Македония; ⁴ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Росздрава; ⁵ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Владикавказ

В последнее время достигнут значительный прогресс в понимании молекулярной медицины в целом и молекулярной биологии клетки в частности. Молекулярная медицина — это направление науки, изучающее нормальное состояние человека и патологические нарушения на клеточно-молекулярном уровне: с точки зрения работы генов, функционирования белков-посредников, отвечающих за доставку информации к различным органам и системам нашего организма, взаимодействия клеток между собой.

Ключевые слова: молекулярная генетика; гастроинтестинальные стромальные опухоли; глиевк.

MOLECULAR-GENETIC METHODS FOR DIAGNOSTICS OF TUMOUR GROWTH

Plotnikova N.A.¹, Sabirov A.Kh.⁴, Myrksin S.A.¹, Singh R.B.², Kazani Zulfear³, Kharitonov S.V.¹, Kanaev P.M.¹, Albegova Zh.K.⁵

¹N.P. Ogarev Mordovsky State University; ²Halberg Hospital and Research Institute, India; ³Republic of Macedonia; ⁴Tyumen State Medical Academy; ⁵North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russia

Considerable progress has recently been achieved in understanding molecular medicine in general and molecular biology in particular. Molecular medicine is a scientific discipline studying man under normal condition and pathological changes at the cellular-molecular level with reference to gene activity and function of protein mediators responsible for delivery of information to various organs or systems of the body and cell-to-cell interaction.

Key words: molecular genetics; gastrointestinal stromal tumours; glivec.

В настоящее время известны многие механизмы контроля клеточного деления и смерти, поддержания генетической стабильности, путей передачи сигнала от рецепторов в ядро и т. д. Известно более 100 белков и/или генов, изменения которых выявляют в клетках злокачественных новообразований. При этом каждая опухоль является уникальной по набору нарушений, вовлеченных в процессы канцерогенеза.

Материал и методы

Условно можно выделить 6 основных направлений в практической молекулярной диагностике злокачественных новообразований:

- диагностика наследственных форм рака;
- диагностика молекулярных маркеров неблагоприятного прогноза;
- диагностика метастазов;
- диагностика маркеров, свидетельствующих о начальных стадиях опухолевого процесса;
- диагностика полиморфных ДНК-маркеров, увеличивающих риск развития определенного типа опухоли;
- диагностика полиморфных ДНК-маркеров, которые определяют фармакокинетику и фармакодинамику химиопрепаратов, что определяет эффективность лечения конкретного пациента.

Одним из решающих открытий современности является расшифровка генома человека: прочтение его генетического кода, определение общего числа и идентификация многих тысяч человеческих генов, в том числе генов, мутации в которых приводят к тяжелым наследственным заболеваниям. Одним из самых последних достижений является открытие микроРНК (miRNA), координирующих работу целых групп генов. Считают, что нарушение экспрессии генов микроРНК имеет место при многих заболеваниях, в том числе при злокачественных новообразованиях. Морфогенез опухолей представляет собой сложный и продолжительный по времени процесс. Его принято делить на 3 последовательных этапа: инициацию, промоцию, прогрессию.

Используют следующие методы молекулярно-генетической диагностики:

1. Полимеразная цепная реакция. Преимущества: специфичность и высокая чувствительность, позволяющая выявлять минимальные количества злокачественных клеток (1 на 10⁵—10⁶ нормальных), что крайне важно для ранней диагностики опухоли или метастазов, а также для выявления остаточного клона клеток после проведенной терапии.

2. Метод FISH *in situ*. Базируется на использовании меченных флуоресцентными красителями ДНК-проб, специфичных для центромерных районов или уникальных последовательностей хромосом, что позволяет выявлять числовые или структурные хромосомные аномалии.

3. Пиросеквенирование. Метод основан на регистрации люминесценции пирофосфата, образующегося при синтезе ДНК. Преимущества: скорость секвенирова-

ния на 2—3 порядка выше, чем при традиционном методе Сэнгера, возможность анализировать небольшие участки ДНК, содержащие искомую мутацию.

4. Проточно-цитометрический анализ ДНК-статуса клеток (анеуплоидия, содержание клеток в активных фазах клеточного цикла S+G2+M).

5. Исследование микрочипов (DNA-microarray) на основе использования биочипов. Позволяют оценить большой массив генов.

6. Иммуногистохимическое исследование. Позволяет определить наличие белков в клетке и рецепторов для факторов роста на мембране клетки.

Одним из современных методов диагностики этапов морфогенеза опухолевого роста является метод ДНК-диагностики.

ДНК-диагностика по плазме и клеткам крови позволяет обнаружить злокачественную трансформацию клетки, генетическую нестабильность, представленных мутациями или другими изменениями в генах.

ДНК-диагностика по парафинированным образцам опухолевой ткани дает возможность выявить мутации или другие изменения в генах, которые привели к развитию злокачественного новообразования, характерные для данного новообразования клеточные и внутриклеточные изменения.

ДНК-диагностика по парафинированным образцам опухоли позволяет диагностировать гены рецепторов эстрогенов и прогестеронов, гены ростовых факторов на поверхности опухолевой клетки, оценить формирование сосудистого микроокружения опухоли. Чаще всего исследуют рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR).

ДНК-диагностика по парафинированным образцам опухоли позволяет выявить мишени для проведения таргетной терапии (от англ. target — мишень, цель).

Известно, что при выявлении мутации гена С-кит при гастроинтестинальных стромальных опухолях (GIST) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) таргетным является препарат гливек.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день одним из актуальных вопросов в онкологии является определение степени злокачественности и прогноза GIST. Наиболее неблагоприятными прогностическими факторами являются размер опухоли более 5 см, высокая клеточность опухоли, выраженный клеточный атипизм и полиморфизм, инвазивный рост, наличие очагов некроза.

Общеизвестно, что источником развития GIST являются интестинальные клетки — пейсмейкеры (интерстициальные клетки Кахала). Считается, что эти клетки имеют двойственное происхождение из гладких миоцитов и нервных клеток, содержат антиген CD 34 и протоонкоген c-kit.

Термин GIST предложен в 1983 г. М. Mazur и Н. Clark []. В 1998 г. S. Hirota и соавт. [] обнаружили в подобных опухолях мутации в гене c-kit с гиперэкспрессией

тирозинкиназного рецептора (KIT), и с 2000 г. GIST приобрели нозологическую самостоятельность.

GIST составляют 1—3% от числа всех первичных неоплазий ЖКТ, на долю злокачественных GIST приходится 20—50%. Достаточно большое количество этих опухолей остается недиагностированным при жизни в связи с бессистемными клиническими проявлениями, а на аутопсиях их обнаруживают при 2 из 1000 вскрытий.

По частоте встречаемости 40—70% GIST развивается в желудке, 20—40% — в тонкой кишке, 5—15% — в толстой кишке и 2—5% в пищеводе.

Основным иммуногистохимическим маркером GIST является c-kit (CD 117), хотя его экспрессируют также меланомы, сосудистые и другие опухоли. Кроме того, 60—70% GIST экспрессируют антиген CD 34 — рецептор для кроветворных стволовых клеток и эндотелиоцитов; виментин выявляют в 80—100%, GIST гладкомышечный актин — в 30—40%, белок S-100 и нейронспецифическую энолазу — в 1—5%.

Для определения степени злокачественности и прогностических признаков GIST необходимо разрабатывать иммуногистохимические и молекулярно-генетические критерии и особенности этих опухолей.

Нами были изучены 12 случаев гистологически верифицированных GIST-ЖКТ, оперированных в 2000—2012 гг. Эти новообразования, согласно критериям международной гистологической классификации опухолей ЖКТ, соответствовали диагнозу GIST.

У 8 пациентов опухоли локализовались в желудке, у 4 — в кишечнике; из них у 1 в двенадцатиперстной кишке, у 3 — в тощей и подвздошной кишке.

Возраст больных составлял от 27 до 88 лет (в среднем $65,7 \pm 17,1$ года). Преобладали мужчины — 7 (58,4) и 5 (41,6%) женщин.

Во всех случаях было произведено оперативное радикальное вмешательство с последующими курсами химиотерапии (в том числе глибек).

Макроскопически опухоли характеризовались эндо-, экзофитной и смешанной формами роста, наличием изъязвлений, очагов некроза в опухолевой ткани.

Диаметр изучаемых GIST составлял от 3 до 26 см, при этом преобладали (42%) опухоли диаметром менее 5 см. Для гистологического исследования использовали традиционный метод парафиновой заливки с окраской гематоксилином и эозином. При патоморфологической диагностике в 7 (58,4%) случаях диагностирован веретеновидно-клеточный вариант опухоли, в 4 (33,3%) — эпителиоидно-клеточный, в 1 (8,3%) — смешанная форма.

Микроскопически неоплазии веретеновидно-клеточного типа строения отличаются выраженным пре-

обладанием паренхимы опухоли над стромой, плотным расположением опухолевых клеток. Опухолевые клетки имеют веретеновидную форму, сигарообразные ядра, формируют многочисленные палисадо- и вихреобразные структуры.

GIST эпителиоидного типа характеризуются наличием опухолевых клеток полигональной формы с овально-округлыми ядрами с эозинофильной или светлой цитоплазмой. Клетки формируют гнездные скопления, разделенные прослойками соединительной ткани.

Смешанные формы GIST имеют признаки, характерные как для веретеновидных, так и эпителиоидных клеток. В строме различных вариантов GIST выявляются очаги некроза и кровоизлияния.

При анализе иммунофенотипических особенностей GIST и оценке KIT-позитивных клеток следует учитывать мембранную локализацию сигналов, особенно эпителиоидно-клеточных форм.

Белок c-kit (CD117 по стандартной терминологии для лейкоцитарных антигенов) является трансмембранным тирозинкиназным рецептором третьего типа (молекулярный вес 145—160 kd).

По мнению ряда авторов, большинство GIST экспрессируют мутантные формы c-kit, преимущественно в экзонах 11, 9, 13 и 17. В связи с этим наличие разных типов мутаций c-kit является своеобразной молекулярной визитной карточкой GIST и может иметь значение в прогнозе опухолевого роста.

Знание молекулярных механизмов возникновения злокачественных новообразований и методик их выявления дало реальную возможность лечения этих заболеваний на раннем этапе — на этапе предраковых заболеваний.

Заключение

Повышение в последнее время интереса к определению различных молекулярно-биологических маркеров в опухолевой ткани требует разработки новых, точных и надежных методов оценки изменений, происходящих в опухолевых клетках. Основные методы определения статуса белков в ткани основаны на двух подходах: детекции изменений на геномном уровне (по амплификации гена, увеличению числа копий мРНК, наличию мутаций в гене) или белковом (по гиперэкспрессии белка, экспрессии мутантного белка) уровне. В настоящее время продолжается разработка стандартов для определения молекулярно-генетических маркеров. Новые научно-практические исследования в области диагностики, морфогенеза и терапии различных опухолей представляются актуальными.

Сведения об авторах:

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск

Кафедра патологии с курсом патологической физиологии

Плотникова Надежда Алексеевна — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой.

Мырксин Сергей Анатольевич — аспирант кафедры.

Канаев Павел Михайлович — аспирант кафедры.

Харитонов Сергей Викторович — канд. мед. наук, доцент кафедры.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Djeu J.Y., Jiang K., Wei S. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8 (3): 636—40.
2. Raja S.M., Metkar S.S., Froelich C.J. Cytotoxic granule-mediated apoptosis: unraveling the complex mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* 2003; 15 (5): 528—32.
3. Rosenberg S.A., Yang J.C., Schwartzentruber D.J. et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med.* 1998; 4 (3): 321—7.
4. Eaton J.D., Perry M.J., Nicholson S. et al. Allogeneic whole-cell vaccine: a phase I/II study in men with hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Urol. Int.* 2002; 89 (1): 19—26.
5. Malmberg K.J. Effective immunotherapy against cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004; 53 (10): 879—92.
6. Timmerman J.M., Singh G., Hermanson G. et al. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 2002; 62 (20): 5845—52.
7. Toes R.E., Hoeben R.C., van der Voort E.I. et al. Protective anti-tumor immunity induced by vaccination with recombinant adenoviruses encoding multiple tumor-associated cytotoxic T lymphocyte epitopes in a string-of-beads fashion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997; 94 (26): 14 660—5.
8. Chen D.S., Davis M.M. Cellular immunotherapy: antigen recognition is just the beginning. *Springer Semin. Immunopathol.* 2005; 27 (1): 119—27.
9. Surman D.R., Dudley M.E., Overwijk W.W. et al. Cutting edge: CD4+ T cell control of CD8+ T cell reactivity to a model tumor antigen. *J. Immunol.* 2000; 164: 562—5.
10. Slingluff Jr C.L., Petroni G.R., Yamshchikov G.V. et al. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 4016—26.
11. McNeel D.G., Knutson K.L., Schiffman K. et al. Pilot study of an HLA-A2 peptide vaccine using flt3 ligand as a systemic vaccine adjuvant. *J. Clin. Immunol.* 2003; 23: 62—72.
12. Leitner W.W., Hwang L.N., de Veer M.J. et al. Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nature Med.* 2003; 9 (1): 33—9.
13. Marchand M., Punt C.J., Aamdal S. et al. Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur. J. Cancer.* 2003; 39: 70—7.
14. Schuler-Thurner B., Schultz E.S., Berger T.G. et al. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 1279—88.
15. Rosenberg S.A., Dudley M.E. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004; 101 (Suppl. 2): 14 639—45.
16. Dudley M.E., Wunderlich J.R., Robbins P.F. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002; 298 (5594): 850—4.
17. Yee C., Thompson J.A., Byrd D. et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 16 168—73.
18. Ayyoub M., Zippelius A., Pittet M.J. et al. Activation of human melanoma reactive CD8+ T cells by vaccination with an immunogenic peptide analog derived from Melan-A/melanoma antigen recognized by T cells-1. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 669—77.
19. Valmori D., Dutoit V., Ayyoub M. et al. Simultaneous CD8+ T cell responses to multiple tumor antigen epitopes in a multipeptide melanoma vaccine. *Cancer Immun.* 2003; 3: 15.

Поступила 09.02.14
Received 09.02.14