

М. А. Сазонова¹, Т. П. Казубская², Е. Л. Корчагина², В. Д. Ермилова², Р. Ф. Гарькавцева²,
Ф. А. Амосенко¹, В. Н. Калинин^{1,3}

АНАЛИЗ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ ГЕНА K-RAS ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

² НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

³ Клиника Эппендорф, Гамбургский университет, Гамбург

Проведен молекулярный анализ мутаций в 1-м экзоне гена *K-ras* (кодоны 12 и 13) в образцах опухолей больных спорадической аденокарциномой толстой кишки и поджелудочной железы. С помощью полимеразной цепной реакции, рестрикционного анализа, SSCP-анализа и автоматического секвенирования выявлено 6 типов мутаций: 4 типа в 12-м кодоне и 2 — в 13-м. При аденокарциноме толстой кишки мутации идентифицированы у 37,3% больных, при аденокарциноме поджелудочной железы — у 44,4%. Преобладающей мутацией в обеих группах больных являлась замена GTCT в 12-м кодоне гена *K-ras*, частота которой составляет 27,6 и 33,3% соответственно. Показана зависимость между частотой мутаций и степенью дифференцировки опухоли, ее локализацией в толстой кишке и возрастом пациентов.

Ключевые слова: аденокарцинома толстой кишки, аденокарцинома поджелудочной железы, мутации гена *K-ras*.

Рак толстой кишки — одно из самых распространенных злокачественных новообразований у человека. Рак поджелудочной железы встречается реже. Однако, по оценкам разных исследователей, это заболевание приводит к смерти практически 100% больных [3]. Развитие аденокарциномы поджелудочной железы и толстой кишки протекает с минимальными клиническими проявлениями, поэтому, несмотря на совершенствование методов диагностики, эти опухоли только в небольшом числе случаев диагностируют на ранних стадиях. Поиск новых методов ранней диагностики аденокарциномы поджелудочной железы и толстой кишки основан на понимании их молекулярной этиологии.

В последнее время в клинических исследованиях показана диагностическая значимость определения мутаций генов семейства Ras — *H-ras*, *K-ras*, *N-ras* [12]. Эти гены кодируют близкородственные мембраносвязанные белки (p21ras), состоящие из 188—189 аминокислотных остатков. Эти белки обладают ГТФазной активностью и относятся к группе так называемых G-белков. Семейство белков Ras играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток. Белки p21ras участвуют в передаче различных сигналов в клетке. Нарушение функции p21ras меняет сигнальную систему, что, в свою очередь, приводит к трансформации клетки. Этим объясняется высокая частота соматических мутаций в протоонкогене *K-ras* при опухолях разной локализации. Мутации в этом гене содержат около 30% всех неоплазий человека. Мутации *K-ras* появляются на ранних стадиях опухолевого процесса — в полипах и мелких аденомах толстой кишки.

Это позволяет рассматривать их в качестве перспективных маркеров для ранней диагностики злокачественных опухолей [27]. Чаще всего встречаются точечные замены в 12-м и 13-м кодонах 1-го экзона *K-ras* [13; 31; 33].

В настоящей работе проведен молекулярный анализ мутаций гена *K-ras* (кодоны 12 и 13) в образцах опухолей больных спорадической аденокарциномой толстой кишки и поджелудочной железы с целью оценки их диагностической значимости.

Материалы и методы

Образцы опухолей

Материалом для исследования послужили образцы опухолей, полученные от 60 больных. У 51 больного диагностированы злокачественные опухоли толстой кишки (у 50 — аденокарцинома, у 1 — беркиттоподобная лимфома), у 9 — злокачественные опухоли поджелудочной железы (у 8 — аденокарцинома, у 1 — карциноид). Всем больным выполняли радикальное или паллиативное хирургическое лечение. Клинические характеристики пациентов приведены в табл. 1.

Отбор образцов опухолей из операционного материала проводили методом микродиссекции под гистологическим контролем. Полученные препараты содержали не менее 70% опухолевых клеток. В качестве контроля использовали 55 образцов гистологически верифицированных нормальных тканей, полученных от больных раком толстой кишки, а также 9 образцов неизмененных лимфоцитов периферической крови, полученных от больных раком поджелудочной железы. Все образцы после гистологической верификации хранили в жидком азоте.

Генетические исследования

Геномную ДНК из образцов опухолевых и нормальных тканей, а также из лимфоцитов периферической крови выде-

Таблица 1

Клинические характеристики больных с новообразованиями толстой кишки и поджелудочной железы

Локализация опухоли	Пол ^a	Возраст, годы	Стадии				Всего
			I	II	III	IV	
Толстая кишка	23/28	60,7±9,2	1	11	22	17	51
слепая кишка	2/2	57,5±9,5	—	—	2	2	4
поперечная ободочная кишка	6/6	54,3±12,3	—	2	6	4	12
сигмовидная кишка	8/14	62,0±9,4	—	5	8	9	22
ректосигмоидный отдел	3/2	64,5±8,5	—	2	3	—	5
прямая кишка	5/3	64,0±7,5	—	2	4	2	8
Поджелудочная железа	4/5	64±7,8		3	4	2	9

^a Мужчины / женщины.

ляля с помощью набора «QIAamp Blood and Tissue Kit» фирмы «QIAGEN» по соответствующим протоколам.

При ПЦР-амплификации фрагментов *K-ras* (157 и 200 пар оснований (п. о.)), содержащих 12-й и 13-й кодоны, использовали следующие праймеры: 1) 5'/ACTGAATATAAАСТТGTGGTAGTTGGACCT 3'/ и 5'/TCAAAGAATGGTCCTGGACC 3'/ для фрагмента размером 157 п. о. [13]; 2) 5'/GТАCTGGTG-GAGTATTTGATA 3'/ и 5'/ACTCATGAAAATGGTCAGAGA 3'/ для фрагмента размером 200 п. о.

Реакционная смесь объемом 35 мкл содержала 0,3–0,4 мкг геномной ДНК, 25 пмоль каждого праймера, 200 мкмоль дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 10 ммоль трис-НСl (рН 8,3), 50 ммоль КСl, 2 ммоль MgCl₂ и 1,5 ед. Таq-полимеразы («Perkin Elmer»). Режим ПЦР: денатурация ДНК при температуре 95°C в течение 3 мин, затем при температуре 94°C в течение 1 мин, при температуре 55°C в течение 1 мин и при температуре 72°C — 30 с, всего 30 циклов с заключительным синтезом при 72°C в течение 7 мин [13].

Рестрикционный анализ продуктов ПЦР (фрагмент 157 п. о.) проводили с помощью эндонуклеазы BstNI в условиях, рекомендованных изготовителем («New England BioLabs»), определение продуктов рестрикции — методом электрофореза в полиакриламидных гелях после окрашивания их бромистым этидием; SSCP-анализ амплифицированного 1-го экзона гена *K-ras* (157 и 200 п. о.) проводили безизотопным методом, как описано ранее [2]. Секвенирование амплифицированного фрагмента гена *K-ras* (200 п. о.), содержащего аномалии, выявленные в ходе SSCP-анализа или рестрикционного анализа, проводили с помощью автоматического секвенатора фирмы «Applied BioSystems» (модель 377) и системы «BigDye-terminators» в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Для оценки достоверности полученных результатов использовали общепринятые методы вариационной статистики [1].

Результаты и обсуждение

Частота мутаций при раке толстой кишки и поджелудочной железы

Соматические мутации в специфическом участке гена *K-ras* (кодоны 12 и 13) лишают продукт гена способности

к естественной инактивации, и он постоянно стимулирует рост клеток. Эти мутации очень часто обнаруживают при доброкачественных и злокачественных опухолях толстой кишки, легкого, поджелудочной железы [6]. Выявление мутаций в опухолях, метастазах и, что особенно ценно, в секретируемых жидкостях является важным и информативным методом диагностики заболевания, контроля результатов лечения и оценки прогноза.

Для выявления соматических мутаций гена *K-ras* мы применили двухэтапный подход. Экзон 1 на первом этапе амплифицирован (фрагменты размером 157 и 200 п. о.) с праймерами, описанными выше. В первом случае праймер вводит в ген дикого типа искусственные сайты узнавания рестрикционной эндонуклеазы BstNI. Продукт ПЦР размером 157 п. о., не содержащий мутации, имеет два сайта для эндонуклеазы, что приводит к образованию трех фрагментов размерами 114, 29 и 14 п. о. При наличии мутации вследствие исчезновения одного из сайтов рестрикции образуются фрагменты размером 143 и 14 п. о. (рис. 1) [13]. В качестве альтернативы для предварительного анализа на первом этапе мы применили также SSCP-анализ. По изменению распределения одноцепочечных фрагментов размерами 157 и 200 п. о. при проведении электрофореза в полиакриламидном геле оказалось возможным обнаруживать мутации не только в 12-м кодоне, но и реже встречающиеся мутации в 13-м кодоне (рис. 2). Причем в случае каждой мутации распределение одноцепочечных фрагментов было строго специфическим.

На втором этапе для точного обнаружения и идентификации мутаций определяли нуклеотидную последовательность 1-го экзона в тех образцах, где обнаружены рестрикционные фрагменты или SSCP-аномалии, отличные от дикого типа. В табл. 2 приведены результаты исследования мутаций гена *K-ras* у пациентов с опухолями толстой кишки и поджелудочной железы из нашей выборки. У обследованных больных выявлено 6 различных мутаций, затрагивающих 12-й и 13-й кодоны гена *K-ras*. Все они относятся к однонуклеотидным заменам. При аденокарциноме толстой кишки самой частой из них является известная замена GTCT в 12-м кодоне (21,6% случаев). Для 7 опухолевых образцов результаты рестрикционного анализа подтверждены секвенированием. У па-

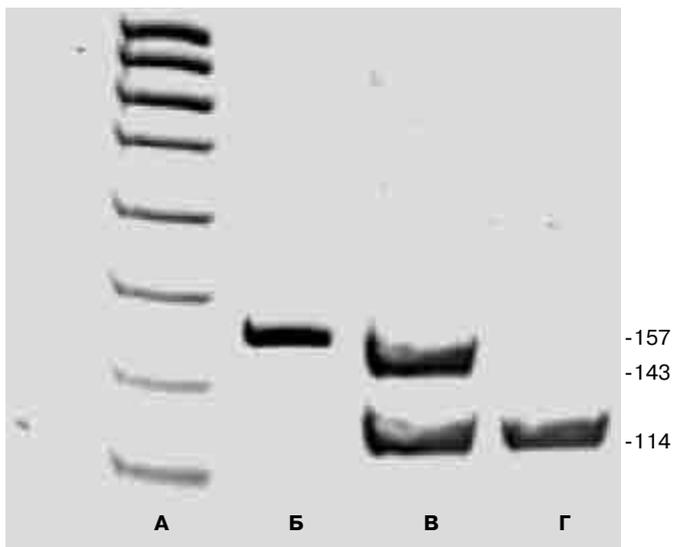


Рисунок 1. Идентификация мутации GGT GCT в 12-м кодоне гена *K-ras* методом ACRS (создание искусственного сайта рестрикции).

А. — Маркер молекулярного веса (*Msp*I-фрагменты рUC19). **Б.** — Амплификат фрагмента 1-го экзона гена *K-ras* (157 п. о.) до рестрикции *Bst*NI. **В.** — Образец ДНК с мутацией GGT GCT в 12-м кодоне (гетерозиготное состояние) после рестрикции эндонуклеазой *Bst*NI. **Г.** — Образец ДНК здорового донора после рестрикции эндонуклеазой *Bst*NI.

циентов с аденокарциномой поджелудочной железы частота точечной мутации GGTGCT в 12-м кодоне составила 33,3% (табл. 2). С помощью SSCP-анализа выявлены и с помощью автоматического секвенирования идентифицированы еще 5 известных мутаций *K-ras*. Секвенировано 9 образцов с мутациями, отличными от замены GTCT в 12-м кодоне, и 4 контрольных образца (без аномалий гена *K-ras*). Результаты SSCP-анализа представлены на рис. 2. Общая частота мутаций гена *K-ras* составила 37,3% при аденокарциноме толстой кишки (31,4% мутаций в 12-м кодоне и 5,9% в 13-м) и 44,4% при аденокарциноме поджелудочной железы.

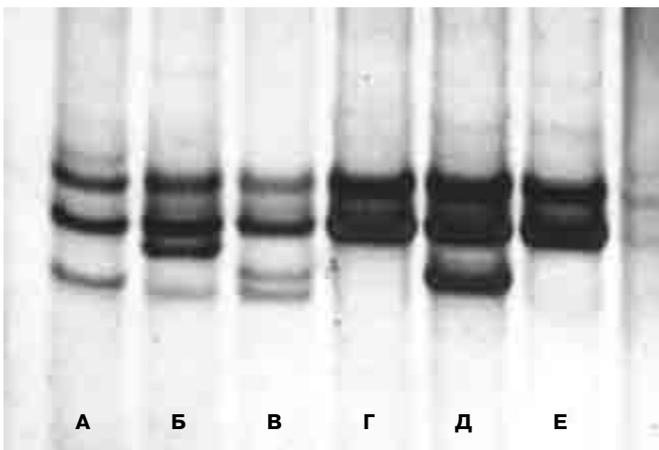


Рисунок 2. SSCP-анализ мутаций гена *K-ras*.

А. — Образец ДНК с мутацией GGC GAC в 13-м кодоне (гетерозиготное состояние). **Б.** — Образец ДНК с мутацией GGT AGT в 12-м кодоне (гетерозиготное состояние). **В.** — Образец ДНК с мутацией GGT GCT в 12-м кодоне (гетерозиготное состояние). **Г.** — Образец ДНК здорового донора. **Д.** — Образец ДНК с мутацией GGT GAT в 12-м кодоне (гетерозиготное состояние). **Е.** — Образец ДНК здорового донора.

При беркиттоподобной лимфоме толстой кишки и карциноме поджелудочной железы мутации гена *K-ras* обнаружены не были. Мутаций также не было ни в одном из исследованных образцов нормальных тканей толстой кишки и поджелудочной железы, а также в нормальных лимфоцитах периферической крови.

Клинико-морфологические аспекты молекулярно-генетических исследований рака толстой кишки и поджелудочной железы

Рак поджелудочной железы и толстой кишки относится к опухолям поздней манифестации. Возраст обследованных нами больных составил 29—85 лет, средний возраст больных с опухолями толстой кишки — $60,7 \pm 9,2$ года, больных с опухолями поджелудочной железы — $64,0 \pm 7,8$ года, что совпадает со средним возрастом пациентов с этими заболеваниями в США (62,5 и 65,4 года соответственно) [14; 23]. Женщин в исследованной нами группе было несколько больше, чем мужчин: 28 из 51 (54,9%) больного с опухолями толстой кишки и 5 из 9 (55,6%) больных с опухолями поджелудочной железы (табл. 1). Частота мутаций гена *K-ras* у обследованных нами женщин оказалась в 2,6 раза выше, чем у мужчин (28,1 и 10,9% соответственно). Следует отметить, что в США частота мутаций гена *K-ras* при опухолях толстой кишки и поджелудочной железы у мужчин и женщин приблизительно одинакова [28, 29].

Т а б л и ц а 2

Частота мутаций *K-ras* в 12-м и 13-м кодонах при опухолях толстой кишки и поджелудочной железы^а

Мутации	Толстая кишка	Поджелудочная железа
12-й кодон GGT		
GCT ^б	21,6 (11/51)	33,3 (3/9)
AGT	2,0 (1/51)	0 (0/9)
GAT ^в	7,8 (4/51)	0 (0/9)
GTT	0 (0/51)	11,1 (1/9)
13-й кодон GGC		
GAC	3,9 (2/51)	0 (0/9)
CGC	2,0 (1/51)	0 (0/9)
Всего ^{г,д}	37,3 (19/51)	44,4% (4/9)

^а Частота указана в процентах, в скобках представлены абсолютные значения.

^б Различия в частоте мутации GGT GCT в 12-м кодоне между образцами нормальных тканей и образцами опухолей толстой кишки и поджелудочной железы статистически достоверны ($p < 0,005$ и $p < 0,05$ соответственно).

^в Различия в частоте мутации GGT GAT в 12-м кодоне между образцами нормальных тканей и опухолей толстой кишки статистически достоверны ($p < 0,005$).

^г Различия общей частоты мутаций в 1-м экзоне гена *K-ras* между образцами нормальных тканей и образцами опухолей толстой кишки и поджелудочной железы статистически достоверны ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно).

^д Достоверных различий в общей частоте мутаций в 1-м экзоне гена *K-ras* между образцами опухолей поджелудочной железы и толстой кишки нет.

Вследствие того что большинство образцов были получены от пациентов с III—IV стадиями заболевания (39 из 51 и 6 из 9 соответственно) (табл. 1), определить зависимость между частотой мутаций гена *K-ras* и прогрессией опухоли в нашей выборке оказалось невозможным.

В табл. 3 представлены клиничко-морфологические данные 4 больных раком поджелудочной железы, у которых были обнаружены мутации гена *K-ras*. У этих больных были диагностированы в основном поздние стадии заболевания. Возраст пациентов, у которых были выявлены мутации, составил в среднем 64 года. Только у 4 из 9 больных раком поджелудочной железы имелись родственники 1-й степени, страдавшие злокачественными опухолями, причем в 2 случаях был выявлен семейный рак поджелудочной железы. По данным литературы, семейный рак поджелудочной железы составляет лишь небольшую часть новообразований этой локализации и причиной его развития могут быть наследственные факторы [20]. Более существенными факторами, выявления групп риска являются семейный хронический панкреатит и длительно существующий сахарный диабет. Однако из наших пациентов с мутациями только 1 больная длительное время страдала сахарным диабетом.

Сопоставление клиничко-генеалогических характеристик и молекулярных изменений при раке поджелудочной железы позволяет нам сказать, что мутации онкогена *K-ras* не зависят от степени дифференцировки, прогрессии опухоли и наследственной предрасположенности в случае семейного рака этой локализации.

Полученные результаты позволяют предположить, что в развитии рака поджелудочной железы могут играть существенную роль мутации гена *K-ras*. Это соответствует данным литературы, согласно которым мутации *K-ras* выявляются у 71—100% больных аденокарциномой поджелудочной железы [4; 6; 16; 18; 19].

Рак толстой кишки представляет собой этиологически гетерогенное заболевание. Мы обследовали 51 пациента: 50 больных с аденокарциномой толстой кишки и 1 больного с беркитгоподобной лимфомой. Средний возраст больных составил 61,6 года, т. е. больные злокачественными опухолями толстой кишки несколько моложе больных злокачественными опухолями поджелудочной железы. Кроме того, женщины, больные раком толстой кишки, были несколько старше мужчин (62,9 и 59,9 года соответственно). В табл. 4 представлена частота мутаций гена *K-ras* в зависимости от

возраста больных раком толстой кишки. Частота замен в гене *K-ras* в возрасте 50—55 лет в 2,8 раза превышает таковую в возрасте 56—70 лет ($p < 0,05$).

Изучение семейного анамнеза у 51 больного злокачественными опухолями толстой кишки показало, что у 20 из них имелось семейное накопление различных злокачественных новообразований, причем в 3 случаях идентифицирован синдром раковых семей (синдром Линча II типа). В семейном анамнезе 7 из 19 больных, у которых были выявлены мутации гена *K-ras*, также имелись указания на накопление опухолей толстой кишки, которые встречались как отдельно, так и в сочетании с другими злокачественными новообразованиями. Однако ни в одной из родословных признаков наследственного варианта рака толстой кишки обнаружено не было. Эти данные позволяют предположить, что мутации гена *K-ras* важной роли в развитии семейного рака толстой кишки не играют.

Результаты молекулярных исследований показали, что в России частота точечных мутаций гена *K-ras* у пациентов со спорадической аденокарциномой толстой кишки разных стадий и дифференцировки составляет 37,3%. Это совпадает с данными, полученными в Швейцарии (39,2%), Нидерландах (39,0%) и Италии (40,0%) [13; 26; 32; 34]. Между тем в Германии и Ирландии частота мутаций гена *K-ras* значительно выше (73,3 и 76,0% соответственно) [9; 17], а в Китае несколько ниже (27,6%) [35]. Доминирующей мутацией в нашем исследовании оказалась замена GTCT в 12-м кодоне, которая преобладает также у больных раком толстой кишки в Японии (44,7%) [13]. Суммарная частота мутаций в 13-м кодоне гена *K-ras* у больных раком толстой кишки в нашем исследовании составила 5,9% (табл. 2), что примерно в 2 раза меньше частоты аналогичных мутаций у пациентов из Швейцарии и Кореи (9,8 и 11,0% соответственно) [10; 25].

Для удобства анализа обследованные больные с аденокарциномой толстой кишки были распределены в соответствии с общепринятой классификацией степени дифференцировки и локализации опухоли (табл. 5 и 6). Табл. 5 отражает частоту и спектр мутаций гена *K-ras* в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Анализ результатов молекулярно-генетических исследований показал следующее. Максимальное число замен (13 из 19 мутаций) обнаружено в образцах умереннодифференцированных опухолей, вероятно, вследствие того, что в исследованной выборке эта группа была самой многочисленной. Следует отметить, что у больных этой группы обнаружены 5 типов мутаций в 12-м и 13-м кодонах. Са-

Т а б л и ц а 3

Клиничко-морфологические характеристики пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы и мутациями в 12-м кодоне гена *K-ras*

Пол и возраст	Стадия	Гистологический тип	Семейные накопления опухолей	Мутации
Женский, 58 лет	IV	Аденокарцинома умеренной степени дифференцировки	Мать и дочь — рак головки поджелудочной железы	GGT GCT
Женский, 60 лет	II	Аденокарцинома разной степени дифференцировки с преобладанием низкой	Мать и дочь — рак головки поджелудочной железы	GGT GCT
Женский, 69 лет	IIIb	Аденокарцинома разной степени дифференцировки	Без накоплений	GGT GTT
Мужской, 72 года	IIIa	Аденокарцинома умеренной степени дифференцировки	Отец и мать — рак желудка, сын — рак поджелудочной железы	GGT GCT

Таблица 4

Частота точечных мутаций гена *K-ras* в зависимости от возраста больных злокачественными опухолями толстой кишки^а

Возраст, годы	Частота мутаций, %
29—49	50,0 (3/6)
50—55	60,0 (6/10)
56—70	21,7 (5/23)
71—85	45,5 (5/11)

^а В скобках представлены абсолютные значения.

мая частая из них — замена GGT на GCT в 12-м кодоне. Она выявлена в 7 образцах. Однако максимальная частота мутаций гена *K-ras* выявлена при высокодифференцированной аденокарциноме (71,4%). Поскольку опухоль возникает из одного клона клеток, высокая частота мутаций гена *K-ras* при высокодифференцированной аденокарциноме и отсутствие нарастания частоты и изменения типа мутаций при снижении степени дифференцировки опухоли подтверждают предположение о том, что мутации гена *K-ras* возникают достаточно рано, а сам ген, скорее всего, не участвует в прогрессии опухоли. Эти данные подтверждаются исследователями из Нидерландов, которые не выявили различий между типами мутаций гена *K-ras* и стадиями рака толстой кишки [7; 8].

В табл. 6 представлено распределение частоты точечных мутаций гена *K-ras* в зависимости от локализации опухоли толстой кишки. Наибольшее количество мутаций выявлено нами при опухолях сигмовидной кишки (8 из 19 мутаций) ($p < 0,01$). При опухолях этой локализации мы обнаружили 5 типов мутаций. В целом максимальное число замен в гене *K-ras* оказалось при опухолях левой половины ободочной кишки, ректосигмоидного отдела и прямой кишки (16 из 19 мутаций) ($p < 0,001$), вероятно, из-за того, что эта группа больных оказалась самой многочисленной (43 из 50 пациентов). Тем не менее наибольшая частота исследованных нами мутаций гена *K-ras* отмечена при опухолях правой половины

Таблица 6

Частота мутаций гена *K-ras* при раке толстой кишки в зависимости от локализации опухоли

Локализация опухоли	Частота мутаций, %
Слепая кишка	0 (0/3)
Поперечная ободочная кишка ^б	
восходящий отдел	75,0 (3/4)
нисходящий отдел	37,5 (3/8)
Сигмовидная кишка ^в	36,4 (8/22)
Ректосигмоидный отдел ^г	60,0 (3/5)
Прямая кишка	25,0 (2/8)

^а В скобках представлены абсолютные значения.
^б Различия в частоте мутаций при опухолях слепой кишки по сравнению с опухолями восходящего и нисходящего отделов поперечной ободочной кишки статистически достоверны ($p < 0,005$ и $p < 0,05$ соответственно).
^в Различия в частоте мутаций между опухолями слепой и сигмовидной кишки статистически достоверны ($p < 0,005$).
^г Различия в частоте мутаций между опухолями слепой кишки и ректосигмоидного отдела толстой кишки статистически достоверны ($p < 0,05$).

ободочной кишки (3 из 7 больных, 42,9%), в то время как при опухолях левой половины ободочной кишки, ректосигмоидного отдела и прямой кишки она составила 37,2% (16 из 43 больных). Эти данные согласуются с результатами, полученными в Венгрии [24] и Нидерландах [5]. Существует мнение, что точечные мутации гена *K-ras* при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки могут быть причиной более неблагоприятного прогноза заболевания, тогда как те же мутации при опухолях левой половины толстой кишки не влияют на выживаемость [5; 24].

Согласно литературным данным, мутации гена *K-ras* присутствуют почти во всех случаях аденокарциномы под-

Таблица 5

Частота мутаций гена *K-ras* у больных раком толстой кишки в зависимости от гистологической структуры опухоли^а

Опухоль	Частота мутаций, %	Тип мутаций
Высокодифференцированная аденокарцинома	71,4 (5/7)	GGT GCT (3/7)
Умереннодифференцированная аденокарцинома	33,3 (13/36)	GGT GCT (7/36) GGT AGT (1/36) GGT GAT (2/36) GGC GAC (2/36) GGC CGC (1/36)
Низкодифференцированная аденокарцинома	25,0 (1/4)	GGT GCT (1/4)
Аденокарцинома разной степени дифференцировки ^б	0 (0/3)	—

^а В скобках представлены абсолютные значения.

^б Различия в частоте мутаций при высокодифференцированной и умереннодифференцированной аденокарциноме толстой кишки по сравнению с аденокарциномой разной степени дифференцировки статистически достоверны ($p < 0,001$).

желудочной железы и в половине случаев опухолей толстой кишки человека. Наличие мутаций при аденокарциноме поджелудочной железы и их отсутствие при опухолях поджелудочной железы эндокринного происхождения, а также при хроническом панкреатите и в норме позволяют предполагать, что исследование мутаций гена *K-ras* можно использовать для оценки прогноза и эффективности лечения, а также для формирования групп риска рака поджелудочной железы [11; 15; 22]. Возможность выявления мутаций гена *K-ras* в секрете поджелудочной железы или в клетках слизистой протока поджелудочной железы, полученных во время эндоскопического исследования, в содержимом двенадцатиперстной кишки и даже в стуле существенно облегчает решение этих задач. Обнаружение мутаций гена *K-ras* в перечисленных выше биологических материалах свидетельствует в пользу рака поджелудочной железы, тогда как их отсутствие — в пользу доброкачественной опухоли [30].

Результаты многочисленных исследований, посвященных прогностическому значению мутаций гена *K-ras* при опухолях толстой кишки у человека, весьма противоречивы. В ряде работ не удалось показать связь между мутациями гена *K-ras* и злокачественными опухолями толстой кишки [21]. В других исследованиях, включая самое многочисленное на сегодняшний день исследование, в которое были включены 1413 пациентов, показано, что наличие мутаций гена *K-ras* все же является фактором прогноза [28]. Несовпадение результатов исследований, по нашему мнению, можно объяснить включением в исследование небольшого числа пациентов и использованием разных методов определения мутаций гена *K-ras* (гибридизации, рестрикционного анализа, SSCP-анализа и DGGE-анализа), обладающих разной разрешающей способностью. Все эти методы являются перспективными, т. к. позволяют проводить быстрый скрининг диспластических поражений всех участков толстой кишки с целью формирования групп риска.

Обнаружение мутаций гена *K-ras* при опухолях толстой кишки позволяет использовать их в качестве молекулярных маркеров прогноза заболевания и контроля эффективности лечения. Как и при раке поджелудочной железы, эта задача облегчается возможностью выявления мутаций гена *K-ras* в биологических материалах: стуле и биопсийном материале, кишечном содержимом и плазме. С целью повышения точности молекулярного прогноза при опухолях толстой кишки ряд авторов предлагают одновременно использовать несколько генетических маркеров, определяющих одинаковые или разные этапы малигнизации.

Работа финансировалась грантами Федеральной научнотехнической программы «Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении» (проект №05 «Генодиагностика и генотерапия социально значимых заболеваний человека»), а также в рамках государственного контракта 43.004.11.2526 «Технологии генодиагностики и генотерапии».

ЛИТЕРАТУРА

1. Айала Ф. Введение в популяционную и эволюционную генетику. — М.: Мир, 1984. — 330 с.
2. Амосенко Ф. А., Трубникова И. С., Захарьев В. М. и др. Полиморфизм TUB9 в гене TPBM больных муковисцидозом, носителей и здоровых доноров Московского региона. SSCP-анализ и рестрикционный анализ // Генетика. — 1997. — Т. 33, №2. — С. 257—261.

3. Ahlgren J. D. Epidemiology and risk factors in pancreatic cancer // Semin. Oncol. — 1996. — Vol. 23, N 2. — P. 241—250.
4. Almoguera C., Shibata D., Forrester K. et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes // Cell. — 1988. — Vol. 53. — P. 549—554.
5. Bleeker W. A., Hayes V. M., Karrenbeld A. et al. Impact of K-ras and TP53 mutations on survival in patients with left- and right-sided Dukes' C colon cancer // Am. J. Gastroenterol. — 2000. — Vol. 95, N 10. — P. 2953—2957.
6. Boss J. L. Ras oncogenes in human cancer: a review // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49. — P. 4682—4689.
7. Bouzourene H., Gervaz P., Cerottini J. P. et al. p53 and Ki-ras as prognostic factors for Dukes' stage B colorectal cancer // Eur. J. Cancer. — 2000. — Vol. 36. — P. 1008—1015.
8. Brink M., de Goeij A. F., Weijenberg M. P. et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study // Carcinogenesis. — 2003. — Vol. 24, N 4. — P. 703—710.
9. Clarke G. A., Ryan E., Crowe J. P. Tumour-derived mutated K-ras codon 12 expression in regional lymph nodes of stage II colorectal cancer patients is not associated with increased risk of cancer-related death // Int. J. Colorectal Dis. — 2001. — Vol. 16, N 2. — P. 108—111.
10. Doolittle B. R., Emanuel J., Tuttle C. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma // Exp. Mol. Pathol. — 2001. — Vol. 70, N 3. — P. 289—301.
11. Gong X., Chen Y. K-ras mutations in pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma // Zhonghua Nei. Ke. Za Zhi. — 1999. — Vol. 38, N 10. — P. 673—676.
12. Haber D. A., Fearon E. R. The promise of cancer genetics // Lancet. — 1998. — Vol. 351 (suppl. 2). — P. 1—8.
13. Haseva H., Ueda M., Watanabe M. et al. K-ras gene mutations in early colorectal cancer flat-elevated vs polyp-forming cancer // Oncogene. — 1995. — Vol. 10. — P. 1413—1416.
14. Kardon D. E., Thompson L. D., Przygodzki R. M. et al. Adenosquamous carcinoma of the pancreas: a clinicopathologic series of 25 cases // Mod. Pathol. — 2001. — Vol. 14, N 5. — P. 443—451.
15. Kubrusly M. S., Cunha J. E. M., Bacchella T. et al. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic diseases: a study in a Brazilian casuistic // J. Pancreas. — 2002. — Vol. 3, N 5. — P. 144—151.
16. Kubrusly M. S., Mutheucci E. J., Leite K. R. M. et al. Detection of codon 12 in the K-ras oncogene in pancreatic tumors // Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo. — 1999. — Vol. 54. — P. 17—20.
17. Lauschke H., Caspari R., Friedl W. et al. Detection of APC and k-ras mutations in the serum of patients with colorectal cancer // Cancer Detect. Prev. — 2001. — Vol. 5, N 1. — P. 55—61.
18. Lemoine N. R., Jain S., Hughes C. et al. Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer // Gastroenterology. — 1992. — Vol. 102. — P. 230—236.
19. Levi S., Urbano-Ispizua A., Gill R. et al. Multiple K-ras codon 12 mutations in colangiocarzinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique // Cancer Res. — 1991. — Vol. 51. — P. 3497—3502.
20. Lynch H., Smyrk T., Scott E. et al. Familial pancreatic cancer: a review // Sem. Oncol. — 1996. — Vol. 23, N 2. — P. 251—275.
21. Morrin M., Kelly M., Barrett N. et al. Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance // Gut. — 1994. — Vol. 35. — P. 1127—1131.
22. Nishikama T., Maemura K., Hirata I. et al. A simple method of detection K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis // Clin. Chim. Acta. — 2002. — Vol. 318, N 1—2. — P. 107—112.
23. Paal E., Thompson L. D., Frommelt R. A. et al. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 35 anaplastic carcinomas of the pancreas with a review of the literature // Ann. Diagn. Pathol. — 2001. — Vol. 5, N 3. — P. 129—140.

24. *Pajkos G., Kiss I., Sandor J. et al.* The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer // *Anticancer Res.* — 2000. — Vol. 20, N 3A. — P. 1695—1701.
25. *Park T. J., Han S. U., Cho Y. K.* Methylation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma // *Cancer.* — 2001. — Vol. 92, N 11. — P. 2760—2768.
26. *Rengucci C., Maiolo P., Saragoni L. et al.* Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7, N 3. — P. 590—593.
27. *Sagara E., Bautista D., Dorta G. et al.* Genetic heterogeneity in sporadic colorectal adenomas // *J. Pathol.* — 1997. — Vol. 181, N 3. — P. 281—286.
28. *Samowitz W. S., Curtin K., Schaffer D. et al.* Relationship of K-ras mutations in colon cancers to tumor localization, stage, and survival: population-based study // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2000. — Vol. 9. — P. 1193—1197.
29. *Slebos R., Hoppin J., Tolbert P.* K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2000. — Vol. 9. — P. 1223—1232.
30. *Tada M., Komatsu Y., Kawabe T. et al.* Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography — guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor // *Am. J. Gastroenterol.* — 2002. — Vol. 97, N 9. — P. 2263—2270.
31. *Tada M., Yokosuka O., Omata M. et al.* Analysis of Ras gene mutations in biliary and pancreatic tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing // *Cancer.* — 1990. — Vol. 66. — P. 930—935.
32. *Tortola S., Steinert R., Hantschick M.* Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* — 2001. — Vol. 19, N 11. — P. 2837—2843.
33. *Suto T., Habano W., Sugai T. et al.* Alteration of the K-ras, p53, and APC genes in extrahepatic bile duct cancer // *J. Surg. Oncol.* — 2000. — Vol. 73. — P. 158—163.
34. *Van Engeland M., Roemen G. M., Brink M. et al.* K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer // *Oncogene.* — 2002. — Vol. 21. — P. 3792—3795.
35. *Yuan P., Sun M. H., Zhang J. S. et al.* APC and K-ras gene mutation in aberrant crypt foci of human colon // *World J. Gastroenterol.* — 2001. — Vol. 7, N 3. — P. 352—356.

Поступила 04.07.2003

*M. A. Sazonova¹, T. P. Kazubskaya², E. L. Korchagina², V. D. Ermolova², R. F. Garkavtseva²,
F. A. Amosenko¹, V. N. Kalinin^{1,3}*

ANALYSIS OF K-RAS GENE MUTATIONS IN ADENOCARCINOMA OF THE COLON AND PANCREAS

¹ *Medicogenetic Research Center RAMS, Moscow*

² *Institute of Clinical Oncology, N. N. Blokhin CRC RAMS, Moscow*

³ *Eppendorf Clinic, University of Hamburg, Hamburg*

Molecular analysis of K-ras first exon (codons 12 and 13) mutations was performed in tumor specimens from patients with sporadic adenocarcinomas of the colon and pancreas. Polymerase chain reaction, restriction enzyme digest, SSCP analyses, and automated sequencing discovered 6 mutation types including 4 types in codon 12 and 2 types in codon 13. The mutations were identified in 37.3% of colonic adenocarcinomas and 44.4% of pancreatic adenocarcinomas. Most mutations were GTCT replacements in codon 12 of K-ras that were detected at a frequency 27.6 and 33.3% respectively. Mutation frequency was found to be related to tumor differentiation, location in the colon and patient age.

Key words: colonic adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma, K-ras gene mutations.