

УДК 616.37-006.6-07-08:577.23 (476)
**ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Е. М. Шпадарук, Р. М. Смолякова, А. И. Шмак, Э. В. Макаревич

**Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, г. Минск**

Цель исследования: оценить диагностическую значимость молекулярно-генетических маркеров при раке поджелудочной железы.

Материал исследования. Данные о больных раком поджелудочной железы и пациентах с хроническим псевдотуморозным панкреатитом. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведен анализ точечных мутаций гена K-ras; определение мутаций в генах BRCA1, 2; анализ определения статуса метилирования промоторного участка гена p16INK4A. У 67 % больных раком поджелудочной железы и у 63,6 % пациентов с хроническим псевдотуморозным панкреатитом выявлен мутантный ген K-ras. Мутации в гетерозиготном состоянии в гене BRCA1 выявлены у 6,7 % больных раком поджелудочной железы, а в гене BRCA2 — у 13 % пациентов. Диагностика мутаций в гене K-ras у пациентов с псевдотуморозным панкреатитом сопряжена с высоким риском трансформации в аденокарциному поджелудочной железы. Аберрантное гиперметилирование гена p16INK4A детектировано у 41 % пациентов с раком поджелудочной железы, что свидетельствует об агрессивном генотипе и неблагоприятном прогнозе.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы (РПЖ), хронический панкреатит, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

**EVALUATION OF DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE
OF MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA**

T. M. Shpadaruk, R. M. Smolyakova, A. I. Shmak, E. V. Makarevich

**Republican Research Center for Oncology and Medical Radiology
named after N. N. Alexandrov, Minsk**

The purpose of the study: to evaluate the diagnostic value of molecular genetic markers in pancreatic cancer.

Subjects. Data on patients with pancreatic cancer and patients with chronic pseudo tumor-like pancreatitis. The point mutations in K-ras gene were analyzed using polymerase chain reaction (PCR); the mutations in BRCA1, 2 genes were determined, the status of methylation of promoter segment of p16INK4A gene was analyzed.

67 % patients with pancreatic cancer and 63,6 % patients with chronic pancreatitis detected the mutant K-ras gene. 6,7 % patients with pancreatic cancer revealed the BRCA1 gene mutations in the heterozygous state, 13 % patients revealed the gene BRCA2 mutations. Diagnosis of the K-ras gene mutations in patients with pseudo tumor-like pancreatitis is conjugated with high risk of transformation of the pancreas to adenocarcinoma. 41 % patients with pancreatic cancer detected aberrant hypermethylation of p16INK4A gene, which is indicative of its aggressive genotype and poor prognosis.

Key words: pancreatic cancer (PCa), chronic pancreatitis, polymerase chain reaction (PCR).

Введение

Рак поджелудочной железы (РПЖ), характеризующийся очень агрессивным течением и плохим прогнозом, занимает 4–5-е место среди причин смерти от онкологических заболеваний. По разным данным, на момент постановки диагноза у 10–15 % пациентов имеется резектабельная опухоль и среди них хорошие отдаленные результаты возможны только у части радикально оперированных [1].

До настоящего времени не удалось добиться улучшения в диагностике и снижении смертности от рака поджелудочной железы в отличие от других нозологических форм злокачественных новообразований. В связи с этим рак поджелудочной железы остается заболеванием с крайне низкой выживаемостью и неблагоприятным прогнозом.

Исследования молекулярно-биологических причин возникновения рака становится все более актуальной проблемой. Целый ряд фундаментальных фактов свидетельствует о ключевой роли поврежденных молекул ДНК в развитии опухолевого процесса. Все вновь приобретенные свойства раковой клетки находятся под контролем генов. Поэтому представляется важным определение молекулярных первопричин заболевания, общих закономерностей и механизмов регуляции опухолевой клетки. Исследование функций этих генов и путей их взаимной регуляции в опухоли позволяет понять механизмы патогенеза. Количество картированных и клонированных генов, вовлеченных в канцерогенез, постоянно увеличивается. Прогресс в молекулярной биологии в последние десятилетия позволяет все более уверенно говорить о генетических механизмах

развития рака поджелудочной железы. Взаимоотношения онкогенов и супрессивных генов опухоли показывают, что они могут играть важную роль в развитии этого заболевания.

Для повышения эффективности диагностики и лечения необходимо более глубокое понимание патофизиологических изменений, которые происходят на молекулярном уровне при раке поджелудочной железы. Можно надеяться, что улучшение понимания молекулярных изменений при раке поджелудочной железы позволит разработать более эффективные стратегии диагностики и лечения этой патологии [2].

Цель исследования

Оценить диагностическую значимость молекулярно-генетических маркеров при раке поджелудочной железы.

Материалы и методы

Материалом настоящего исследования послужили данные о больных раком поджелудочной железы I–IV стадии и пациентах с хроническим псевдотуморозным панкреатитом, находившихся на лечении в онкологическом абдоминальном отделении РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова в 2005–2011 гг.

Больные включались в исследование с обязательным морфологическим подтверждением диагноза. При анализе степени распространенности опухолевого процесса установлено, что в группе больных РПЖ преобладала (54 %) IV стадия. Количество больных раком

поджелудочной железы I стадии составило 3 %, II — 18,4 %, III — 24,6 %.

Возраст пациентов, включенных в исследование, варьировал от 39 до 82 лет. Средний возраст составил $61,4 \pm 11,3$ года. Наиболее многочисленной оказалась группа пациентов (30 %) в возрасте от 61 до 70 лет.

У пациентов с РПЖ, имеющих II стадию заболевания, средний возраст составил $60,3 \pm 10,3$ года, III — $53,8 \pm 11,9$ года, IV — $65,6 \pm 9,6$ года. Статистически значимые различия в возрасте выявлены у пациентов с III и IV стадиями заболевания ($p_{\text{Манн-Уитни}} = 0,004$).

Методом селективной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с рестрикцией эндонуклеазой BstNI (REMS-PCR) проведен анализ точечных мутаций в первом и втором основании 12-го кодона 1-го экзона гена K-ras. Материалом исследования служили свежемороженые образцы опухоли больных раком поджелудочной железы и биоптаты поджелудочной железы больных панкреатитом. Геномную ДНК из образцов опухолевых тканей выделяли с помощью наборов «QIAamp DNA Blood Mini Kit» фирмы «Qiagen» (Германия) в соответствии с инструкцией.

Молекулярно-генетическое определение мутаций в генах BRCA1, 2 осуществлялось с помощью набора реагентов фирмы PRONTO (Израиль) методом ПЦР. Учет результатов проводился визуально (рисунок 1).

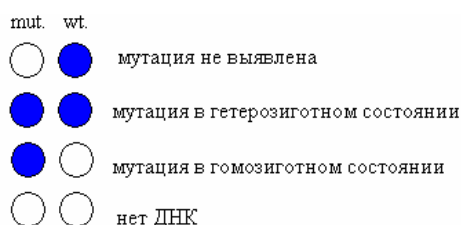


Рисунок 1 — Визуальный учет мутаций в генах BRCA1, BRCA2

Анализ определения статуса метилирования промоторного участка гена p16INK4A осуществлялся методом ПЦР с использованием амплификатора «iCycler» (BioRad, США). Бисульфитная конверсия проводилась с помощью набора «Qiagen Bisulfite Kit» (Qiagen, Германия).

Для оценки диагностической значимости результатов ПЦР-метода определения гиперметилирования промоторного участка гена p16INK4A и определения мутаций в гене K-ras рассчитывали диагностическую чувствительность (ДЧ), диагностическую специфичность (ДС), диагностическую эффективность (ДЭ).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли на компьютере EPoX с процессором AMD Sempron™ 2000 Mhz. С помощью компьютерной программы Microsoft

Office Excel, 2007 уточняли значения средних арифметических (M), среднеквадратических отклонений (σ) и ошибок среднего (m). Характер распределения выборок оценивался в программе «Statistica», 6.0 (StatSoft Ink, США).

Результаты и обсуждение

Пациентам с раком поджелудочной железы проведен анализ мутаций гена K-ras методом REMS-PCR. Исследовано 62 образца опухолевой ткани больных раком поджелудочной железы и 11 биопсий ткани поджелудочной железы больных хроническим псевдотуморозным панкреатитом. У 42 (67 %) пациентов с раком поджелудочной железы и у 7 больных хроническим псевдотуморозным панкреатитом (63,6 %) выявлен мутантный ген K-ras в первом и втором основании 12-го кодона 1-го экзона.

Известно, что аденокарциномы поджелудочной железы имеют мутированный ген K-ras, поэтому выявление мутации рассматривается как молекулярно-генетический маркер РПЖ. При раке поджелудочной железы мутации гена K-ras также детектируются в панкреатическом соке, желчи, периферической крови, кале [3]. В последнее десятилетие обнаружено, что мутации в гене K-ras с высокой частотой встречаются в гиперпластических протоках,

ассоциированных с хроническими панкреатитами [4]. Эти генетические основы могут, в свою очередь, привести к возможной трансформации хронического панкреатита в карциному поджелудочной железы, и есть предположение, что K-ras мутации являются ранним событием в панкреатическом канцерогенезе [5].

Данные по клиническим стадиям и частоте выявления мутаций гена K-ras представлен на рисунке 2.

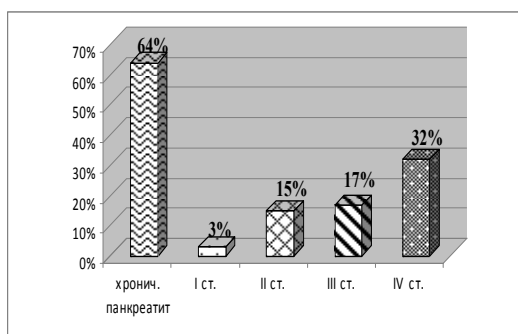


Рисунок 2 — Частота выявления мутаций гена K-ras у больных РПЖ и хроническим панкреатитом в зависимости от клинической стадии

Как видно на рисунке 2, у больных хроническим панкреатитом мутации гена K-ras выявлены в 63,6 % случаев, что может говорить о высокой вероятности трансформации заболевания в карциному поджелудочной железы. Среди больных раком поджелудочной железы с I стадией заболевания мутация гена K-ras выявлена у 3 %; при II стадии — 15 %; III — 17 %; IV — у 32 % пациентов. Детекция мутации в гене K-ras у пациентов с РПЖ ассоциирована с агрессивным течением заболевания и низкой общей выживаемостью по сравнению с пациентами, имеющими дикий тип гена [6].

Диагностическая чувствительность использования ПЦР-метода определения мутаций в гене K-ras составила 88,7 %, диагностическая специфичность — 95,3 %, диагностическая эффективность — 97,8 %.

Гены BRCA1 и BRCA2 являются классическими опухолевыми супрессорами. Для инициации опухолевого роста, помимо врожденной мутации, в одном из аллелей необходима

инактивация второго аллеля, которая происходит уже в соматической клетке. Как правило, мутации в генах BRCA1 и BRCA2 ведут к прекращению синтеза полноразмерных ядерных фосфобелков (1863 и 3495 аминокислот соответственно), которые за счет разнообразных белок-белковых взаимодействий участвуют в регуляции репарации ДНК и размножении клеток. Особенностью мутаций генов BRCA1 и BRCA2 является то, что они характерны для наследственных форм новообразований и значительно реже обнаруживаются в ненаследственных опухолях той же локализации [7].

При определении мутаций в гене BRCA1 (185delAG) у 11 пациентов с раком поджелудочной железы выявлена в гетерозиготном состоянии 1 (6,7 %) мутация, а при детекции мутаций в гене BRCA2 (6174delT) — 2 (13 %) мутации. Частота выявления мутаций в генах-супрессорах опухолевого роста BRCA1 и BRCA2 представлена на рисунке 3.

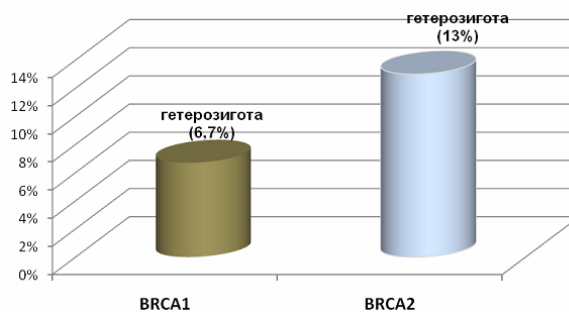


Рисунок 3 — Частота выявления мутаций в генах BRCA1, BRCA2 у больных раком поджелудочной железы

Согласно литературным данным, мужчины-носители дефектных форм гена BRCA1 имеют невысокий риск развития РПЖ, в то время как мужчины-носители мутаций в гене BRCA2 имеют риск развития РПЖ в течение жизни в 20 % случаев.

Для оценки статуса метилирования гена p16INK4A исследовано 69 образцов опухолевой ткани больных раком поджелудочной железы и 13 биопсий ткани поджелудочной железы пациентов с хроническим псевдотуморозным панкреатитом.

Аберрантное метилирование CpG-островков является ранним событием в процессе возникновения опухоли. Например, гиперметилирование промоторного региона гена супрессора опухолевого роста p16INK4A при плоскоклеточном раке легкого было обнаружено уже в гиперплазии. Мутации, делеции и метилирование гена p16INK4A, вызывающие потерю экспрессии одного или обоих его белковых продуктов, часто наблюдаются в наследственных и спорадических меланом, в большой группе других наследственных новообразований: раке под-

желудочной железы, пищевода, желчных путей, мочевого пузыря, Т- и В-клеточных острых лимфолейкозах, мезотелиомах, анапластических астроцитомах, глиобластомах и др. [8].

Мутации в гене p16 в опухолях редки и практически тканеспецифичны для рака поджелудочной железы. Известно, что снижение экспрессии гена p16INK ассоциировалось с худшей выживаемостью и с нарастанием морфологических изменений [9]. Считается, что мутации гена встречаются на самых ранних этапах канцерогенеза рака поджелудочной железы и даже при ранних формах неоплазии [10].

В проведенном исследовании по определению статуса метилирования промоторного участка гена p16 у 29 (41 %) пациентов с раком поджелудочной железы диагностирован метилированный промоторный участок, что можно связать с плохим прогнозом для жизни и резистентностью к химиотерапии в послеоперационном периоде [11].

Данные по клиническим стадиям РПЖ и частоте выявления метилированного промоторного участка гена p16INK4A представлены на рисунке 4.

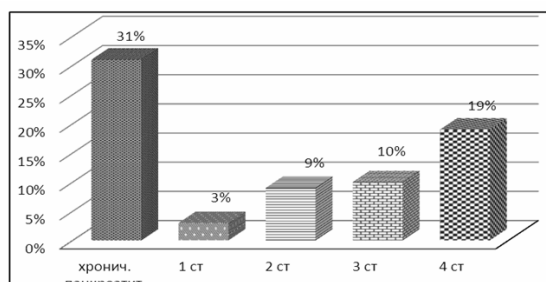


Рисунок 4 — Частота выявления метилированного промоторного участка гена p16INK4A у пациентов с РПЖ и хроническим панкреатитом в зависимости от клинической стадии

Как видно на рисунке 4, у пациентов с хроническим панкреатитом метилирование промоторного участка гена p16INK4A отмечено в 31 % случаев. Среди пациентов с раком поджелудочной железы с I стадией заболевания метилирование гена p16 выявлено у 3 %, при II стадии — у 9 %, III — 10 %, IV — у 19 % больных РПЖ.

Диагностическая чувствительность определения гиперметилирования промоторного участка гена p16INK4A в опухолевой ткани пациентов с раком поджелудочной железы составила 87,3 %, диагностическая специфичность — 98,1 %, диагностическая эффективность — 95,3 %.

Заключение

Выявление мутаций гена в протоонкогене K-ras при раке поджелудочной железы и хроническом псевдотуморозном панкреатите имеет высокую диагностическую ценность, которая характеризуется диагностической чувствительностью — 88,7 %, диагностической специфичностью — 95,3 %, диагностической эф-

фективностью — 97,8 %. Диагностика мутаций в гене K-ras у 63,6 % пациентов с псевдотуморозным панкреатитом сопряжена с высоким риском трансформации в аденокарциному поджелудочной железы.

Аберрантное гиперметилирование гена p16INK4A детектировано у 41 % пациентов с раком поджелудочной железы, что свидетельствует об агрессивном генотипе, устойчивости к стандартным методам терапии и неблагоприятном прогнозе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Сравнительная характеристика результатов пилоросохраняющей панкреатодуоденальной резекции и операции Вилла при злокачественных образованиях поджелудочной железы / Г. Ф. Муслимов [и др.] // J. Cerrahliq. — 2007. — Т. 1, № 9. — С. 65–74.
2. Xu, Z.-W. Molecular of pancreatic cancer / Z.-W. Xu, H. Friess, M. W. Buchler // J. of Exp. Oncol. — 2000. — № 22. — P. 8–14.
3. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma / M. Tada [et al.] // Cancer Res. — 1993. — № 53. — P. 2472–2474.
4. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia / C. Caldas [et al.] // Cancer Res. — 1994. — № 54. — P. 3568–3573.

5. Analysis of K-ras oncogene mutations in chronic pancreatitis with ductal hyperplasia / J. A. Rivera. [et al.] // *Surgery*. — 1997. — Vol. 121. — P. 42–49.
6. Castells, A. K-ras mutations in DNA extracted from plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance / A. Castells, Puig, J. Mora // *J. Clin. Oncology*. — 1999. — № 17. — P. 578–584.
7. Bradley, A. Introduction: BRCA1 and BRCA2 in mammary gland development and tumorigenesis / A. Bradley, D. Medina // *J. Mammary gland BiolNeoplasia*. — 1998. — № 3(4). — P. 363–364.
8. Sherr, C. J. Pasing Ink4a/Arf: «pure» p16-null mice/ C. J. Sherr // *Cell*. — 2001. — Vol. 106. — P. 531–534.
9. Immunohistochemical analysis of p53 and MIB-1 in tissue specimens obtained from endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration biopsy for the diagnosis of solid pancreatic masses / T. Itoi [et al.] // *Oncol. Rep.* — 2005. — № 13. — P. 229–234.
10. Кочатков, А. В. Молекулярно-генетические факторы при раке поджелудочной железы / А. В. Кочатков, И. Б. Зборовская, В. А. Кубышкин // *Хирургия*. — 2003. — № 4. — С. 61–65.
11. Molecular alteration associated with improved survival in pancreatic cancer patients treated with radiation or Chemotherapy / S. T. Dergman [et al.] // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* — 1998. — № 5. — P. 272–296.

Поступила 30.07.2012

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 546.799.4 + 546.799.5]:543.53

РАДИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗОТОПОВ ПЛУТОНИЯ И АМЕРИЦИЯ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ АЛЬФА-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

А. К. Довнар, А. В. Лысенкова

Гомельский государственный медицинский университет

В статье представлены основные методы, применяемые в радиохимической подготовке образцов для альфа-спектрометрии, рассмотрены их преимущества и недостатки.

Ключевые слова: альфа-излучающие радионуклиды, альфа-спектрометрия, методы извлечения радионуклидов, методы концентрирования, разделения и очистки, методы приготовления счетных образцов.

RADIOCHEMICAL METHODS FOR DETERMINATION OF PLUTONIUM AND AMERICIUM ISOTOPES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES BY ALPHA-SPECTROMETRY

A. K. Dovnar, A. V. Lysenkova

Comel State Medical University

The article presents the principal methods used in radiochemical preparation of alpha-spectrometry samples as well as describes the major parameters of the methods, their advantages and drawbacks.

Key words: alpha emitters, alpha spectrometry, sample destruction methods, preconcentration, separation and purification methods, source preparation techniques.

Введение

Интенсивное развитие атомной энергетики и расширяющееся использование радиоактивных изотопов в медицине, космической технике и научных исследованиях обуславливают необходимость осуществления их надежного контроля в объектах окружающей среды и биологических материалах.

В последние три десятилетия, особенно в связи с Чернобыльской катастрофой, большое внимание во всем мире уделяют долгоживущим альфа-излучающим трансурановым элементам (ТУЭ) — изотопам $^{238,239,240}\text{Pu}$ и ^{241}Am . В результате аварии на Чернобыльской АЭС загрязнение территории Республики Беларусь изотопами $^{238,239,240,241}\text{Pu}$ с плотностью более $0,37 \text{ кБк/м}^2$ охватывает $4,0 \text{ тыс. км}^2$, или почти 2 % площади республики [1]. Более того, нали-

чие в чернобыльском выбросе значительного количества ^{241}Pu (β -излучатель, $T_{1/2} = 14,4$ года) приводит к увеличению содержания ^{241}Am ($T_{1/2} = 432$ года), который вследствие своей более высокой геохимической подвижности представляет еще большую радиологическую опасность, чем ^{239}Pu . К настоящему времени около 70 % чернобыльского ^{241}Pu уже распалось и превратилось в ^{241}Am , причем активность этого изотопа продолжает увеличиваться и достигнет максимума к 2060 г., превысив активность суммы изотопов плутония приблизительно в два раза [2].

Методы, применяемые в радиохимической подготовке образцов для альфа-спектрометрии

Альфа-спектрометрия — широко распространенный метод определения активности альфа-излучающих трансурановых радионук-