

¹О.А. Вострюхина,
¹Т.А. Штам, ¹Н.В. Мохова,
²А.В. Гуляев, ²О.Ф. Чепик,
¹В.А. Ланцов

¹Институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова РАН,
Гатчина;
²НИИ онкологии
им. проф. Н.Н. Петрова,
Санкт-Петербург

✿ Карциномы желудочно-кишечного тракта человека (ЖКТ) могут развиваться по супрессорному, *p53*-зависимому или мутаторному путям. У последнего ослаблена коррекция неспаренных оснований ДНК. Эти альтернативные пути сопряжены с различиями в клинико-патологических характеристиках и терапии заболевания. Мутаторный путь проявляется в нестабильности микросателлитов (MSI) генома. Все карциномы ЖКТ могут быть с высоким (MSI-H), низким (MSI-L) или нулевым (MSS) уровнем MSI. 34 образца ДНК из карцином ЖКТ анализировали по девяти микросателлитным повторам генома и пяти экзонам гена *p53* для поиска корреляции между уровнем MSI и целостностью гена *p53*. Показано, что с большой вероятностью, карциномы MSI-H мутаторного типа, тогда как карциномы MSI-L и MSS развиваются по супрессорному пути.

✿ **Ключевые слова:** карциномы желудочно-кишечного тракта человека; система коррекции неспаренных оснований; микросателлитная нестабильность генома; конформационный полиморфизм однонитевых молекул ДНК; электрофорез в денатурирующих условиях.

УРОВЕНЬ НЕСТАБИЛЬНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ И МУТАЦИИ ГЕНА *p53* В КАРЦИНОМАХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА

ВВЕДЕНИЕ

Карциномы желудочно-кишечного тракта человека (ЖКТ) могут развиваться по двум путям — супрессорному, *p53*-зависимому и мутаторному, *p53*-независимому [10].

Первый путь характеризуется мутациями в генах *APC*, *K-ras*, *DCC* и *p53*. Инициирование же второго связано с частичной инактивацией системы коррекции неспаренных оснований ДНК (КНО). Дефектность КНО проявляется в микросателлитной нестабильности (*microsatellite instability*, *MSI*) генома, по степени выраженности которой все карциномы ЖКТ могут быть разделены на три класса: с высокой или низкой нестабильностью микросателлитов и со стабильными микросателлитами, что обозначается символами MSI-H (*MSI high*), MSI-L (*MSI low*) и MSS (*MS stable*) соответственно [2]. До настоящего времени данные о корреляции между уровнем MSI и генетическими путями развития карцином носят неоднозначный характер, особенно для опухолей, проявляющих низкую степень MSI [8, 11, 19, 20, 24]. Известно, что карциномы MSI-H отличаются от карцином MSS по клиническим проявлениям заболевания, патологоанатомическим характеристикам опухолей и чувствительности к терапевтическим агентам. Колоректальные опухоли с повреждениями системы КНО, как правило, выявляются в более раннем возрасте, склонны к полинеоплазии, являются низкодифференцированными, чаще локализованы в проксимальном отделе ободочной кишки [18]; есть данные и о более высокой выживаемости пациентов с такими опухолями [6]. В экспериментах на ряде клеточных линий [7, 14, 26] и в клинических исследованиях [6] показано, что карциномы ЖКТ в зависимости от их генетической природы имеют различную устойчивость к тем или иным противоопухолевым агентам. Очевидно, что для эффективной терапии конкретного онкологического заболевания важно определить генетический путь его развития. В связи с этим наибольшие трудности возникают с классификацией карцином MSI-L, определением их клинической, патологической и биологической сущности [23]. В частности, необходимо оптимизировать панель чувствительных и специфичных микросателлитных маркеров для выявления MSI разного уровня.

В данной работе мы проанализировали мутационный профиль 34-х образцов ДНК из карцином ЖКТ, используя для определения уровня MSI высокочувствительные маркеры *BAT26* и *BAT40*, а также микросателлитные повторы в составе таких генов-мишеней дефектной работы системы КНО, как *BAX*, *BLM*, *hMSH3*, *hMSH6*, *IGFIIR*,

TGFβRII и *E2F4*. Параллельно проведен поиск мутаций в гене *p53* по пяти экзонам, наиболее часто вовлеченным в мутационный процесс. Предложена процедура первичного анализа ДНК опухоли для определения генетического пути развития карцином.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Образцы тканей и выделение ДНК

В целях увеличения в исследуемой выборке числа опухолей с повреждениями репарационной системы КНО [18] для анализа отбирали опухоли толстой кишки, локализованные в проксимальном отделе ободочной кишки, а также раки желудка и кишечника у пациентов с отягощенной онкологическими заболеваниями семейной историей, хотя и не в строгом соответствии с Амстердамским критерием II [4].

Парафиновые срезы опухолевой и нормальной тканей больных были приготовлены в патолого-анатомической лаборатории НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова, при этом опухолевые образцы содержали не менее 50% раковых клеток. Выделение геномной ДНК из парафиновых срезов проводили с использованием протеиназы К по стандартной методике [9].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Фрагменты ДНК, содержащие исследуемые микросателлиты или экзоны гена *p53*, выделяли из геномной ДНК в паре рак/норма с помощью ПЦР. Амплификацию проводили в пластиковых пробирках (0,5 мл) на аппарате «Терцик» («ДНК-Технология», Москва) в 20 мкл смеси, содержащей 250 мМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов («Медиген», г. Новосибирск), 10 пМ прямого и обратного праймеров («Синтол», Москва), 60-100 нг ДНК, 1 ед Таq-полимеразы в оригинальном буфере («СибЭнзим», г. Новосибирск). Использовали четырнадцать пар праймеров, описанных ранее [3, 12, 22, 28]. Применяли два режима амплификации: (I) для фрагментов с микросателлитами и (II) для экзонов гена *p53*. Режим (I) состоял из следующих стадий: 4 мин при 95°C; затем 35 циклов, включающих денатурацию ДНК при 94°C в течение 30 сек, отжиг праймеров при 55–60°C в течение 40 сек и полимеризацию при 72°C в течение 40 сек; по окончании циклов 7 мин проводили достройку синтезированных цепей при 72°C. Режим (II) состоял из 4 мин при 95°C; затем 35 циклов, включающих описанные выше прогревы 1 мин при 94°C, 1 мин при 55°C и 1 мин при 72°C; после чего 7 мин при 72°C.

Мутационные повреждения в исследуемых фрагментах ДНК

Наличие мутационных повреждений в амплифицированных фрагментах ДНК и характер таких повреждений определяли, используя разновидности электрофореза фрагментов в полиакриламидном геле. Для первичного поиска изменений в структуре ДНК использовали метод *SSCP* (конформационного полиморфизма однонитевых молекул ДНК) [22]. Для определения делеций или инсерций в нуклеотидных повторах генов-мишеней использовали ЭФДУ (метод электрофореза в денатурирующих условиях). Поиск нуклеотидных замен при повреждениях в гене *p53* проводили путем секвенирования ДНК.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием точного метода Фишера [1] и программы Graphpad InStat (демонстрационная версия). Различия между группами считали достоверными на уровне 95% вероятности при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение уровня MSI карцином ЖКТ

Образцы ДНК из опухолевой ткани сравнивали с соответствующей нормой по изменению длины мононуклеотидных повторов *BAT26* (A_{26}) и *BAT40* (A_{40}), локализованных, соответственно, в пятом интроне гена *hMSH2* и во втором интроне гена *3-β-HSD* [21]. При анализе 34 карцином было выявлено 19 (56%) опухолей с вариациями длины *BAT40*, среди которых 11 (32%) показывали нестабильность *BAT26* (табл. 1).

Все образцы были проверены на наличие мутаций в семи генах, контролирующих темп мутагенеза и/или малигнизацию клеток: *BAX*, *BLM*, *hMSH3*, *hMSH6*, *IGFIIR*, *TGFβRII* и *E2F4*. Все они содержат микросателлитные повторы в кодирующей области. Делеция или инсерция одного–двух нуклеотидов в микросателлитах первых шести генов приводит к мутациям сдвига рамки считывания, образованию стоп-кодонов и, как следствие этого, к синтезу аномальных белков [2]. Длинный сегмент белка *E2F4*, содержащий повторы серина, функционирует как транскрипционный домен, и его модификация в результате изменения длины микросателлита $(CAG)_{13}$ может приводить к изменению экспрессии ряда генов, что способствует более активному продвижению клетки по клеточному циклу [27].

Рис. 1а иллюстрирует типичный анализ (электрофореза программы *SSCP* и ЭФДУ) продуктов ПЦР для

Таблица 1

Нестабильность микросателлитов и соматические мутации генов в ДНК опухолей

№ опухоли	Микросателлиты		Гены-мишени дефектной работы системы КНО							n	Уровень MSI	
	BAT40	BAT26	BAX	TGFBR11	hMSH3	hMSH6	BLM	IGFIIR	E2F4			
1-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	MSS
15-20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	MSI-L
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1	
22	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	4	MSI-H
23	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	4	
24	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	4	
25	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	3	
26	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3	
27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	
28	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	4	
29	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	4	
30	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	6	
31	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	4	
32	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	4	
33	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	4	
34	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	5	
Итого	19	11	5	7	2	4	2	3	5			

Примечание: «+» и «-» — обозначают наличие и/или отсутствие повреждения в микросателлите или гене, n — общее количество измененных микросателлитов из 9 исследованных для каждой опухоли.

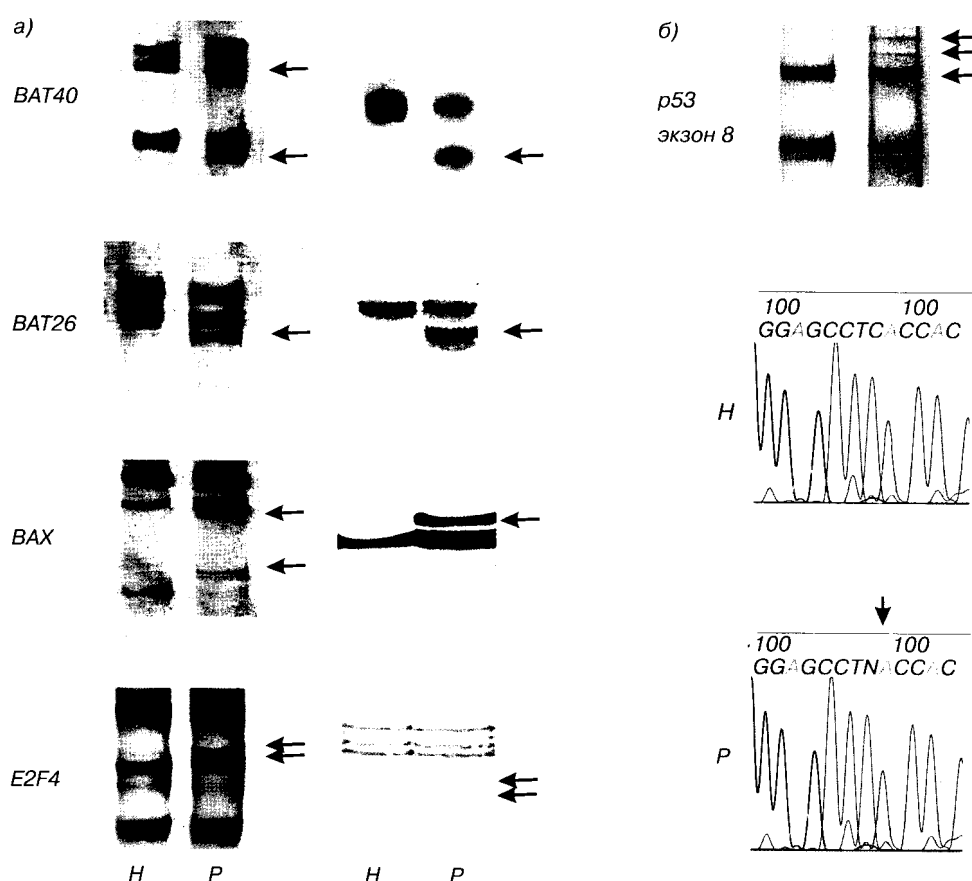


Рис. 1. Примеры анализа продуктов ПЦР для ДНК из нормальных (Н) и раковых (Р) клеток:

а — изменения длины микросателлитов *BAT40*, *BAT26* и микросателлитов в кодирующих участках генов *BAX* и *E2F4* для ДНК из образца № 24 в раковых клетках по сравнению с нормальными по данным SSCP (слева) и ЭФДУ (справа); б — мутация в 8-м экзоне гена *p53* для ДНК из образца № 15 по данным SSCP (вверху) и секвенирования (внизу); буква N в расшифровке электрофореграммы для образца из раковых клеток соответствует гетерозиготной замене [C→A] — аминокислотная замена His→Asn в 296 кодоне; боковые стрелки показывают полосы на электрофореграммах фрагментов ДНК, измененных по сравнению с нормой

Таблица 2

Карциномы ЖКТ человека, нестабильность генома и мутации в гене *p53*

№ опухоли	Локализация опухоли*	Стадия заболевания**	n ***	Уровень MSI	Мутации в гене <i>p53</i>
1	РЖ	II (T3N0M0)	0		+ (5)
2	РЖ	II (T3N0M0)	0		-
3	РЖ	II (T3N0M0)	0		+ (6,7)
4	РЖ	II (T3N0M0)	0		+ (7)
5	РЖ	I (T1N0M0)	0		+ (8)
6	РЖ	н.д.	0		-
7	РЖ	II (T3N0M0)	0		+ (7)
8	РЖ	IV (T4N2M0)	0	MSS	-
9	РТК	IV (T3N4M1)	0		-
10	РТК	II (T3N0M0)	0		+ (5)
11	РЖ	II (T3N0M0)	0		+ (6)
12	РТК	II (T3N0M0)	0		+ (6)
13	РЖ	II (T3N0M0)	0		+ (5)
14	РЖ	IIIa (T3N1M0)	0		+ (7)
15	РЖ	IIIa (T4N0M0)	1		+ (8)
16	РЖ	II (T3N0M0)	1		+ (8)
17	РЖ	I (T2N0M0)	1		+ (8)
18	РТК	IIIb (T3N1M0)	1	MSI-L	+ (7)
19	РТК	I (T2N0M0)	1		-
20	РЖ	I (T1N0M0)	1		+ (6)
21	РТК	I (T2N0M0)	1		+ (7)
22	РЖ	II (T3N0MX)	4		-
23	РЖ	II (T3N0M0)	4		-
24	РТК	II (T3N0M0)	4		-
25	РТК	III (T3N1M0)	3		-
26	РТК	IV (T3N1M1)	3		-
27	РТК	II (T3N0M0)	2		-
28	РТК	III (T4N1M0)	4	MSI-H	-
29	РЖ	II (T3N0M0)	4		-
30	РТК	III (T4N1M0)	6		-
31	РТК	II (T3N0M0)	4		-
32	РЖ	II (T3N0M0)	4		-
33	РТК	IV (T4N1M1)	4		-
34	РЖ	II (T3N0M0)	3		+ (6)

Примечания: * РЖ — рак желудка, РТК — толстой кишки;

** — стадия заболевания для злокачественных опухолей указана в соответствии с классификацией по системе TNM, где Т — размер и распространение первичной опухоли, N — отсутствие или наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах и степень их поражения, M — отсутствие или наличие отдаленных метастазов, арабские цифры указывают на распространенность злокачественного процесса — I–IV стадии заболевания;

*** — n, количество измененных микросателлитов в данной опухоли из 9-ти исследованных (табл. 1);

«+» и «-» обозначают наличие и/или отсутствие мутаций в гене *p53*; скобках указан номер поврежденного экзона;

н.д. — нет данных.

фрагментов ДНК раковых (Р) клеток, в которых обнаружены повреждения микросателлитов по сравнению с нормальными (Н) (образец 24). Эти изменения обнаружены в четырех из девяти исследуемых фрагментов (*BAT40*, *BAT26*, *BAX* и *E2F4*).

Результаты подобного анализа для 34-х образцов ДНК (в паре норма/рак) представлены в табл. 1. Изменение длины микросателлитного участка (A_{10}) гена *TGFβRII* обнаружено в семи образцах. Мутации

в микросателлитах (G_8) гена *BAX* и (CAG)₁₃ гена *E2F4* найдены в пяти образцах, (A_9) гена *BLM* и (A_8) гена *hMSH3* — в одном, а повреждения (C_8) гена *hMSH6* и (G_8) гена *IGFIIR* выявлены в четырех и трех образцах соответственно.

На основании этих данных все карциномы были подразделены на три группы: **MSS**, не имеющие генетических повреждений в девяти маркерах дефектной работы системы КНО (образцы 1–14); **MSI-L**, имеющие повреждение в одном маркере (образцы 15–20) и **MSI-H**, имеющие повреждения в двух и более маркерах (образцы 21–34). Таким образом, MSI выявлена в 59% образцов (20/34), в том числе в 21% случаев (7/34) с низкой и в 38% случаев (13/34) с высокой нестабильностью. Представленные результаты отличаются от данных литературы большей частотой встречаемости карцином MSI-H и MSI-L, что объясняется направленной (в соответствии с клинико-патологоанатомическими характеристиками) выборкой опухолей, развивающихся по мутаторному пути.

Поиск корреляции между уровнем MSI и мутациями гена *p53*

Исследуемые образцы ДНК анализировали на наличие повреждений в гене *p53* по пяти экзонам (с пятого по девятый), наиболее часто вовлеченным в мутационный процесс. Мутации в данной области охватывают более 95% из всех описанных ранее повреждений данного гена [15]. SSCP-анализ амплифицированных фрагментов ДНК выявил 17 (50%) мутированных образцов, из них три образца имели повреждение в экзоне 5, пять — в экзоне 6, шесть — в экзоне 7, четыре — в экзоне 8, и ни один не содержал повреждений в экзоне 9 (табл. 2). Выборочное секвенирование поврежденных фрагментов (образцы № 10, 12, 18) выявило в каждом образце гетерозиготные замены, описанные ранее в базе мутаций гена *p53* для злокачественных новообразований ЖКТ человека [15].

На рис. 1б приведены в качестве примера SSCP-анализ и секвенирование ДНК карциномы № 15. По данным SSCP в экзоне 8 гена *p53* в этом образце присутствует повреждение, характер которого уточнен последующим секвенированием. Эта гетерозиготная мутация (C→A) вызывает замену гистидина на аспарагин в 296 кодоне гена *p53*. Такое повреждение представлено в базе мутаций гена *p53* лишь для карциномы молочной железы и аденокарциномы простаты [15]. Приведенные в данной работе данные дополняют эту базу случаем карциномы ЖКТ.

В табл. 2 сопоставлены мутации гена *p53* с уровнем MSI карцином. Мутации обнаружены в 10 из

Таблица 3

Сравнение данных табл. 1 с данными литературы для карцином ЖКТ с разным уровнем MSI (MSS, MSI-L и MSI-H): повреждения микросателлитов в сайтах *BAT*, генах-мишенях дефектной работы системы КНО, а также повреждения гена *p53*

BAT-сайты, гены и микросателлиты в них	Процент карцином с данным уровнем MSI, несущих мутацию в указанных микросателлитах*					
	MSS		MSI-L		MSI-H	
	по данным:					
	табл. 1	литературы	табл. 1	литературы	табл. 1	литературы
BAT26 (A ₂₆)	0 (14)	0 [13]	0 (7)	0 [13]	92 (13)	97 [13]
BAT40 (A ₄₀)	0 (14)	3 [21]	86 (7)	—	100 (13)	98 [21]
TGFβRII (A ₁₀)	0 (14)	0–0,3 [8, 19, 20]	0 (7) [11]	0	54 (13) [3, 5, 12, 19, 28]	60–90
BAX (G ₈)	0 (14)	0–0,3 [8, 20]	0 (7) [25]	0	38 (13) [5, 8, 20, 25]	13–61
hMSH6 (C ₈)	0 (14)	0–0,5 [20]	0 (7)	—	31 (13) [5, 20]	16–38
hMSH3 (A ₈)	0 (14)	0 [20]	0 (7)	—	15 (13)	13–39 [3, 5, 12, 16, 20]
IGF2R (G ₈)	0 (14)	0 [20]	0 (7)	0 [11]	23 (13)	7–29 [3, 5, 20]
E2F4 (CAG) ₁₃	0 (14)	0 [8]	14 (7)	—	31 (13)	37–61 [5, 8, 12]
BLM (A ₉)	0 (14)	—	0 (7)	—	15 (13)	9–7 [14, 23]
<i>p53</i>	71 (14)	47–60 [6, 8, 11, 19, 20, 24]	85 (7)	55–57 [11, 19, 24]	8 (13)	0–20 [6, 8, 11, 19, 20, 24, 28]
%** карцином с данным уровнем MSI	41	60–80 [3, 20, 28]	21	5–15 [11, 12, 13, 28]	38	15–30 [3, 12, 13, 20]

Примечания: * — в скобках указано количество карцином в выборке с данным уровнем MSI;

** — от общего числа исследованных карцином; в настоящей работе проанализировано 34 карциномы;

«—» — данные в литературе не найдены.

14 (71%) исследованных образцов MSS, в 6 из 7 образцов MSI-L и только в 1 из 13 образцов MSI-H. Таким образом, MSS, так же как и MSI-L, в карциномах ЖКТ определяют развитие опухоли преимущественно по *p53*-зависимому, т. е. супрес-сорному пути ($p = 0,0001$), в то время как в карциномах MSI-H с высокой достоверностью ($p = 0,0001$) ген *p53* не повреждается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленные данные согласуются с описанной в литературе обратной корреляцией между MSI-H и нарушениями функций гена *p53* (табл. 3). Однако в ряде исследований повреждения гена *p53* выявляются в опухолях MSI-H с более высокой частотой, чем описано нами [6, 8, 19, 20, 24, 28]. Это может быть или результатом нестроого разделения генетических путей развития опухолей, или более оптимальным подбором маркеров, использованных нами для выявления карцином MSI-H. В большин-

стве работ в качестве маркеров MSI применяли либо стандартную панель микросателлитов, расположенных в интронных областях генов: так называемая «панель Bethesda» [4], в которую входят два мононуклеотидных (*BAT26* и *BAT25*) и три динуклеотидных повтора (*D5S346*, *D2S123*, *D17S250*), либо набор микросателлитов, расположенных в некодирующих областях и включающих от 6 до 10 маркеров [8, 11, 20, 28]. В нашей работе был использован ряд микросателлитов, локализованных в кодирующих последовательностях генов, непосредственно ответственных за нестабильность генома, которые могут регулировать клеточную пролиферацию или репарацию повреждений (т.е. темп мутагенеза). Как видно из табл. 3, повреждения этих генов-мишеней дефектной работы системы КНО чрезвычайно редко выявляются в карциномах MSI-L и MSS [8, 19, 20, 25]. Это свидетельствует об их прямом участии в развитии новообразований с высоким уровнем MSI, инициированных повреждением системы КНО. Кроме того, динуклеотидные повторы (а тем

более три-, тетра- и пента-) оказываются менее чувствительными для выявления MSI-H, чем мононуклеотидные повторы [23], а последние и были преимущественно использованы в нашей работе.

С помощью программы Graphpad InStat мы проанализировали статистическую значимость каждого из исследованных маркеров при определении уровня MSI. С этой целью для каждого маркера были подсчитаны следующие параметры: p — вероятность случайного отнесения карциномы к одному из путей развития, чувствительность, специфичность, позитивные и негативные предсказательные значения (табл. 4). Выяснилось, что *BAT40* является оптималь-

анализе уровня MSI также очень высокое; различия же между маркерами состоят в их чувствительности и негативном предсказательном значении.

Предлагаемая нами панель для определения уровня MSI состоит из двух наборов мононуклеотидных повторов: основного и дополнительного. В качестве основного набора мы предлагаем использовать два чувствительных повтора *BAT40* и *BAT26* и специфичный микросателлит A_{10} в гене *TGF β RII*. Дополнительный набор включает микросателлиты в составе следующих генов: *BAX*, *hMSH6* и *IGFIIR*. Идентификацию генетического пути развития опухоли проводим по следующей схеме: определяем

Таблица 4

Вероятность случайности, чувствительность, специфичность и предсказательные значения различных маркеров в определении уровня нестабильности микросателлитов генома

Уровни Маркеры	MSI-L и MSI-H		MSI-H						
	<i>BAT40</i>	<i>BAT26</i>	<i>TGFβRII</i>	<i>BAX</i>	<i>hMSH6</i>	<i>IGFIIR</i>	<i>E2F4</i>	<i>hMSH3</i>	<i>BLM</i>
Вероятность (p) случайности*	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	0,0046	0,0154	0,0478	0,0586	0,1390	0,1390
Чувствительность** 95%-й доверительный интервал	0,9500 0,7513– 0,9987	0,8462 0,5458– 0,9808	0,5385 0,2512– 0,8078	0,3846 0,1385– 0,6840	0,3077 0,09099– 0,6140	0,2308 0,05037– 0,5379	0,3077 0,09099– 0,6140	0,1538 0,01921– 0,4542	0,1538 0,01921– 0,4542
Специфичность*** 95%-й доверительный интервал	1,000 0,7682– 1,000	1,000 0,8390– 1,000	1,000 0,8390– 1,000	1,000 0,8390– 1,000	1,000 0,8390– 1,000	1,000 0,8390– 1,000	1,000 0,9524 0,7617– 0,9988	1,000 0,8390– 1,000	1,000 0,8390– 1,000
Позитивное предсказательное значение****	1,000 0,8237– 1,000	1,000 0,7152– 1,000	1,000 0,5903– 1,000	1,000 0,4783– 1,000	1,000 0,3976– 1,000	1,000 0,2924– 1,000	1,000 0,2835– 0,9949	1,000 0,1581– 1,000	1,000 0,1581– 1,000
Негативное предсказательное значение*****	0,9333 0,6806– 0,9983	0,9130 0,7194– 0,9893	0,7778 0,5770– 0,9137	0,7241 0,5275– 0,8725	0,7000 0,5059– 0,8529	0,6774 0,4859– 0,8331	0,6897 0,4918– 0,8473	0,6563 0,4681– 0,8142	0,6563 0,4681– 0,8142

Примечания:

* — определена с использованием точного метода Фишера;

** — доля позитивных по данному маркеру тестов, правильно идентифицировавших карциномы MSI-H (или MSI-H и MSI-L);

*** — доля негативных по данному маркеру тестов, правильно идентифицировавших карциномы MSS (или MSS и MSI-L);

**** — доля позитивных по данному маркеру тестов, правильно идентифицировавших карциномы MSI-H (или MSI-H и MSI-L), от общего числа позитивных тестов;

***** — доля негативных по данному маркеру тестов, правильно идентифицировавших карциномы MSS (или MSS и MSI-L), от общего числа негативных тестов.

ным маркером для отделения карцином MSS от MSI-L и MSI-H ($p < 0,0001$), а *BAT26* эффективно выделяет карциномы MSI-H ($p < 0,0001$). С уровнем статистической достоверности более 95% оказались пригодными для выявления карцином MSI-H и четыре микросателлита в составе генов *TGF β RII* ($p = 0,0003$), *BAX* ($p = 0,0046$), *hMSH6* ($p = 0,0154$) и *IGFIIR* ($p = 0,0478$). Результаты данного исследования не позволяют однозначно определить пригодность микросателлитов в генах *E2F4* ($p = 0,0586$), *BLM* и *hMSH3* ($p = 0,1390$) для анализа уровня MSI.

Отметим, что все маркеры являются высокоспецифичными, за исключением микросателлита в составе *E2F4*, специфичность остальных составляет 1,000. Позитивное предсказательное значение при

уровень MSI в карциноме с помощью основного набора. Если все три микросателлита этого набора оказываются стабильными, карциному относим к классу MSS. Если два или три из них нестабильны — это карцинома MSI-H. Если нестабилен лишь один из этих маркеров, привлекаем к анализу дополнительный набор. В случае стабильности микросателлитов и в этом наборе карцинома относится к классу MSI-L и с большой вероятностью, подобно карциномам MSS, развивается по супрессорному пути. Если же выявляется изменение длины еще хотя бы одного микросателлита, то значительна вероятность принадлежности карциномы к классу MSI-H и развитию опухоли по мутаторному пути. Подчеркнем, что предлагаемый набор маркеров MSI для опреде-

ления путей развития опухолей ЖКТ отличен от того, который использован в панели Bethesda. Мы используем гены, вовлеченные в карциногенез мутаторного типа и только мононуклеотидные микросателлитные повторы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта СПбНЦ 2004.

Принятые сокращения:

ЖКТ — желудочно-кишечный тракт;

КНО — коррекция неспаренных оснований ДНК;

MSI — микросателлитная нестабильность генома;

MSS — микросателлитная стабильность генома;

SSCP — конформационный полиморфизм однонитевых молекул ДНК;

ЭФДУ — электрофорез в денатурирующих условиях.

Литература

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л.: Медицина, 1973.
2. Boland C., Thibodeau S., Hamilton S. et al. A National cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer // *Cancer Res.* — 1998. — Vol. 58. — P. 5248–5257.
3. Calin G., Ranzani G., Amadori D. et al. Somatic frameshift mutations in the Bloom syndrome BLM gene are frequent in sporadic gastric carcinomas with microsatellite mutator phenotype // *BMC Genet.* — 2001. — Vol. 2. — P. 14.
4. Chung D., Rustgi A. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications // *Ann. Intern. Med.* — 2003. — Vol. 138. — P. 560–570.
5. Duval A., Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancer: toward a new concept of target genes for instability // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 2447–2454.
6. Elsaleh H., Powell B., McCaul K. et al. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 1343–1349.
7. Fink D., Nebel S., Norris P.S. et al. The affect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair-deficient tumour cells // *Br. J. Cancer.* — 1998. — Vol. 77. — P. 703–708.
8. Fujiwara T., Stolker J., Watanabe T. et al. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences // *Am. J. Pathol.* — 1998. — Vol. 153. — P. 1063–1078.
9. Goetz S., Hamilton S., Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1985. — Vol. 130. — P. 118–126.
10. Ilyas M., Tomlinson I.P.M. Genetic pathways in colorectal cancer // *Histopathology.* — 1996. — Vol. 28. — P. 389–399.
11. Jass J.R., Biden K.G., Cummings M.C. et al. Characterization of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways // *J. Clin. Pathol.* — 1999. — Vol. 52. — P. 455–460.
12. Kim J., Baek M., Kim L. et al. Accumulated frameshift mutations at coding nucleotide repeats during the progression of gastric carcinoma with microsatellite instability // *Lab. Invest.* — 1999. — Vol. 79. — P. 1113–1120.
13. Loukola A., Eklin K., Laiho P. et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 4545–4549.
14. Manic S., Gatti L., Carenini N. et al. Mechanisms controlling sensitivity to platinum complexes: p53 and DNA mismatch repair // *Curr. Cancer Drug Targets.* — 2003. — Vol. 3. — P. 21–29.
15. Olivier M., Eeles R., Hollstein M. et al. The IARC TP53 Database: new online mutation analysis and recommendations to users // *Hum. Mutat.* — 2002. — Vol. 19. — P. 607–614.
16. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiology factor for colon cancer // *Hum Mol Genetics.* — 2001. — Vol. 10. — P. 735–740.
17. Pestell K., Hobbs S., Titley J. et al. Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line // *Molecular Pharmacol.* — 2000. — Vol. 57. — P. 503–509.
18. Redston M. Carcinogenesis in the GI tract: from morphology to genetics and back again // *Mod. Pathol.* — 2001. — Vol. 14. — P. 236–245.
19. Salahshor S., Kressner U., Glimelius B. et al. Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes // *Genes Chromosomes Cancer.* — 1999. — Vol. 26. — P. 247–252.
20. Samowitz W., Holden J., Curtin K. et al. Inverse relationship between microsatellite instability and k-ras and p53 gene alterations in colon cancer // *Am. J. Pathol.* — 2001. — Vol. 158. — P. 1517–1524.
21. Samowitz W.S., Slattery M.L., Potter J.D. et al. BAT-26 and BAT-40 Instability in Colorectal Adenomas and Carcinomas and Germ-line Polymorphism // *Am. J. Pathol.* — 1999. — Vol. 154. — P. 1637–1641.
22. Steingrimsdottir H., Penhallow J., Farzaneh F. et al. Detection of p53 mutations in oral cancer samples using a sensitive PCR-based method // *Biochem. Soc. Trans.* — 1997. — Vol. 25. — P. 315–318.
23. Umar A., Boland C.R., Terdiman J.P. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2004. — Vol. 96. — P. 261–268.
24. Ward R., Meagher A., Tomlinson I. et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer // *Gut.* — 2001. — Vol. 48. — P. 821–829.
25. Yamamoto H., Itoh F., Fukushima H. et al. Frequent Bax frameshift mutations in gastric cancer with high but not low microsatellite instability // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* — 1999. — Vol. 18. — P. 103–106.
26. Yan T., Berry S.E., Desai A.B., Kinsella T.J. DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells // *Clin. Cancer Res.* — 2003. — Vol. 9. — P. 2327–2334.
27. Yoshitaka T., Matsubara N., Ikeda M. et al. Mutations of E2F4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1996. — Vol. 227. — P. 553–557.
28. Young J., Simms L., Biden K. et al. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic setting // *Am. J. Pathol.* — 2001. — Vol. 159. — P. 2107–2116.

Microsatellite instability level and p53 gene mutations in human carcinomas of gastrointestinal tract

Vostrukhina O.A., Shtam T.A., Mokhova N.V., Gulyaev A.V., Chepick O.F., Lanzov V.A.

B.P. Konstantinov Nuclear Physics Institute, Russian Academy of Sciences; Prof. N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Russia

☼ **SUMMARY:** The human carcinomas of gastrointestinal tract (GIT) are developed via "suppressor" (p53-dependent) or "mutator" (with deficiency in DNA mismatch repair) pathways. These pathways are known to be accompanied by variations in both clinicopathological and therapeutic characteristics. The mutator pathway manifests in genome microsatellite instability (MSI). All GIT carcinomas can be subdivided in three classes, with high (MSI-H), low (MSI-L) and zero (MSS) level of MSI. 34 DNA samples from GIT carcinomas were analyzed with 9 microsatellites and 5 exons of p53 gene in searching for correlation between the level of MSI and mutations in p53. The MSI-H carcinomas appeared to be of mutator type whereas both MSI-L and MSS were of suppressor type.

☼ **KEY WORDS:** human gastrointestinal tract carcinomas; mismatch repair system; genomic microsatellite instability; single-strand conformation polymorphism; denaturing electrophoresis.