

ОБЗОР

УДК 611.33-616.006.66-57.089

©Коллектив авторов

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА ЖЕЛУДКА

Е.В. Елистратова^{1}, П.П. Лактионов¹, П.И. Шелестюк², С.А. Тузиков³,
В.В. Власов¹, Е.Ю. Рыкова¹*

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090,
Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8; тел.: (383)3304654, факс: (383)3333677;
эл. почта: alenakol@mail.ru

²Новосибирский областной онкологический диспансер, Новосибирск

³ГУ НИИ Онкологии Томского научного центра СО РАМН, Томск

Интенсивные исследования молекулярных механизмов онкотрансформации приводят к выявлению новых белков и кодирующих их генов, участвующих в развитии опухолей. Эти белки могут быть использованы как маркеры онкотрансформации клеток, а уровень их экспрессии может быть оценен при помощи современных высокочувствительных и технологичных методов анализа. В данном обзоре систематизированы литературные данные об используемых в настоящее время иммунохимических и молекулярно-генетических маркерах рака желудка. Описаны генетические и эпигенетические изменения, выявляемые в нуклеиновых кислотах клеток ткани опухоли при злокачественных и доброкачественных заболеваниях желудка, а также в ДНК, циркулирующих в крови больных раком желудка.

Ключевые слова: рак желудка, диагностика, онкомаркеры, циркулирующие ДНК

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время рак желудка (РЖ) является четвертой по частоте формой злокачественных новообразований (около 8,6% в структуре онкологической заболеваемости населения мира) и продолжает удерживать второе место в структуре общей летальности от злокачественных новообразований (700000 смертей ежегодно) [1].

Самый высокий показатель 5-летней выживаемости больных раком желудка (52%) зафиксирован в Японии, где с 1960 г. в рамках общей программы медицинского обследования внедрен метод фотофлюорографии. Этот опыт не нашел широкого применения в других странах мира в связи с необходимостью больших затрат, чем объясняется более низкий показатель 5-летней выживаемости (27%) в странах Западной Европы [2]. В ряду 45 стран мира Россия занимает 1-е место по уровню смертности от данного заболевания [3].

Удручающие статистические данные объясняются поздним выявлением рака желудка, когда проведение операции - основного метода радикального лечения этого заболевания, - зачастую становится проблематичным. Доля больных раком 3 стадии, поступающих в стационар, составляет 31,4 %, 4 стадии - 42,6%, при этом 5-летняя выживаемость при радикальном лечении составляет: при I стадии – 80–100%; II – 40–65%; III – 15–35%; IV – 0% [4].

На сегодняшний день ранняя диагностика рака желудка сильно затруднена. Так как опухоль начинает себя проявлять лишь при достижении определённого

* - адресат для переписки

размера, то существующие методы выявления опухолевого процесса, такие как гастроскопия, гистологические, рентгенологические, томографические мало применимы для обнаружения рака на доклинических стадиях, не говоря уже о формировании групп риска на стадиях опухолевой трансформации клеток.

1. БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ.

Применяющиеся в настоящее время иммунохимические и биохимические методы, которые основываются на выявлении онкомаркеров - белков, содержание которых в крови изменяется при онкологических заболеваниях, - неинформативны для ранней диагностики рака желудка. В большинстве случаев диагностическое значение белковые онкомаркеры имеют при сформировавшейся опухоли, что связано с их поздним появлением в крови. Действительно, для повышения концентрации онкомаркеров в крови выше уровня детекции необходимо наличие достаточного количества онкотрансформированных клеток, которые экспрессируют данные маркеры. С другой стороны, онкотрансформированные клетки, которые не экспрессируют повышенный уровень искомых маркеров, не обнаруживаются. В настоящее время при диагностике рака желудка чаще всего используется исследование следующих белковых маркеров: раковый эмбриональный антиген (РЭА), альфа-фетопротеин (АФП), раковый антиген СА 72.4 (СА 72.4), углеводный антиген СА 19.9 (СА 19.9).

Пожалуй, самым известным и широко используемым опухолевым маркером является раковый **эмбриональный антиген (РЭА)**. Это - гликопротеин, вырабатываемый в тканях пищеварительного тракта эмбриона и плода. Синтез РЭА после рождения ребенка подавляется, и у здоровых взрослых людей в сыворотке и в других биологических жидкостях он не обнаруживается [5]. Концентрация РЭА в сыворотке крови повышается (выше 5 нг/мл) при развитии ряда злокачественных новообразований пищеварительной, дыхательной систем, карциномы молочной железы, головы, шеи. Повышение уровня РЭА наблюдается и при доброкачественных заболеваниях печени, легких, аутоиммунных заболеваниях (в 20-50% случаев).

При раке желудка чувствительность первичной диагностики для РЭА не превышает 57,6% специфичность - 79% [6-11]. Показано, что уровень РЭА коррелирует со стадией заболевания раком желудка, глубиной инвазии, вовлечением в злокачественный процесс лимфатических узлов, наличием отдаленных метастазов [12-15]. Было выявлено прогностическое значение РЭА при раке желудка. У пациентов с повышенным уровнем данного маркера показатель пятилетней выживаемости больных раком желудка равнялся 31,7%, у пациентов с недетектируемым РЭА - 77,3% [12]. Чувствительность диагностики при рецидивах рака желудка, основанная на измерении уровня РЭА, по данным Marrelli [16], составила 44%, тогда как при первичной диагностике - 16%, что подтверждается другими исследованиями [7]. Основываясь на данных многочисленных исследований, в настоящее время измерение уровня РЭА при раке желудка применяют с целью определения распространенности онкологического процесса и мониторинга заболевания.

АФП был впервые обнаружен в сыворотке плода в 1956 г. [17]. Этот гликопротеин секретируется в норме клетками желточного мешка, а на поздних сроках печенью и клетками желудочно-кишечного тракта эмбриона. У взрослого человека концентрация в плазме не превышает 15 нг/мл. Повышенное содержание АФП регистрируется при развитии гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли желточного мешка, циррозе печени, гепатитах [5]. Существуют АФП-продуцирующие опухоли различной локализации [15]. Было показано, что на долю больных раком желудка, при котором регистрируется повышенный уровень АФП в сыворотке крови, и который впоследствии был назван раком желудка, продуцирующим альфа-фетопротеин (АФП+РЖ), приходится 1,3-15% [18] от общего числа больных РЖ. Было отмечено более агрессивное течение АФП+РЖ. По исследованиям Kono [19], более 63% больных АФП+РЖ имели

метастазы в печени, и 5-летняя выживаемость в данной группе составила 28,4%, по сравнению с группой больных раком желудка, не продуцирующим АФП (АФП-РЖ), где только 9% имели метастазы в печени и показатель 5-летней выживаемости равнялся 62%. Таким образом, определение уровня АФП в сыворотке позволяет дифференцировать АФП+РЖ от АФП-РЖ, что важно для прогнозирования течения заболевания.

Гликопротеин СА 72.4 (раковый антиген) определяется в сыворотке крови с помощью В72.3 и СС-49 моноклональных антител к СА 72.4 антигену, который является антигенной детерминантой опухолево-ассоциированного гликопротеина 72 [14]. Концентрация этого антигена в сыворотке крови здоровых доноров составляет 0-6 Ед/мл. Повышение уровня СА 72.4 в крови описано у больных с опухолями молочной железы, толстой кишки, эндометрия, легких, карциномой яичника. В некоторых случаях регистрируют повышение уровня СА 72.4 при доброкачественных и воспалительных процессах различной локализации [5].

Чувствительность первичной диагностики РЖ основанная на иммунодетекции СА 72.4 не превышает 58%, однако специфичность составляет около 98% [6, 10, 11]. Многочисленные исследования показали, что повышенный уровень СА 72.4 регистрируется у пациентов с распространенным онкологическим процессом при вовлечении в него лимфатических узлов, брюшины, печени [6, 8, 10, 13]. Уровень СА 72.4 при раке желудка выше нормы свидетельствует о повышенном риске смерти пациента от этого заболевания. Так, по данным Gaspar [13], 3-летняя выживаемость больных с уровнем СА 72.4 выше нормы составляет 34%, тогда как у пациентов с нормальным уровнем СА 72.4 она составляет 69%. По данным Marrelli, чувствительность диагностики рецидивов с использованием СА 72.4 составляет 51%, специфичность - 97% [16]. Таким образом, изменение уровня СА 72.4 помогает сделать вывод о стадии заболевания, распространённости опухолевого процесса и спрогнозировать течение болезни.

Углеводный антиген СА 19.9 представляет собой гликопротеин, который синтезируется эпителиальными клетками поджелудочной железы, желудка, эндометрия и слюнных желез [5, 15], где и обнаруживается в незначительных концентрациях. Повышенный уровень СА 19.9 (выше 37 Ед/мл) регистрируется при онкологических заболеваниях поджелудочной железы (с чувствительностью 70-90% и специфичностью 68-91%) [20], желудочно-кишечного тракта: толстой кишки, желудка, гепато-биллиарной системы, и при доброкачественных заболеваниях печени [15]. При раке желудка чувствительность первичной диагностики иммуноферментного анализа углеводного антигена СА 19.9 не превышает 50% [6, 7, 10, 11]. Невысокая чувствительность первичной диагностики РЖ на основе СА 19.9 возрастает при диагностике рецидивов болезни и составляет 55-56%, при этом анализ характеризуется высокой специфичностью (от 74-94%) [7, 15, 16, 21]. Измерение уровня СА 19.9 позволяет сделать выводы о распространенности онкологического процесса, глубине инвазии, вовлечении в него брюшины, серозы, метастатических поражений лимфатических узлов [6, 8, 13, 15].

Toschi [6] с соавторами исследовали уровень маркеров РЭА, СА 72.4, СА 19.9 в желудочном соке и крови больных раком желудка, больных с доброкачественными заболеваниями желудка и клинически здоровых людей. Интересно, что статистически достоверные отличия между этими группами были обнаружены только в уровне РЭА желудочного сока и СА 19.9 крови. Чувствительность обнаружения рака желудка с использованием комбинированного исследования всех трех маркеров одновременно в крови и желудочном соке составила 81,4%. Однако в другом подобном исследовании Duraker с соавторами пришли к выводу, что определение уровня маркеров РЭА и СА 19.9 в желудочном соке не имеет диагностической и прогностической значимости [22].

В ряде работ было показано, что комбинированное исследование всех опухолевых маркеров в крови не ведет к значительному повышению

чувствительности и специфичности первичной диагностики рака желудка [7, 10, 11]. В связи с этим, основным применением перечисленных белковых маркеров является мониторинг течения заболевания, оценка эффективности лечения и отслеживание рецидива опухоли.

2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ.

Трансформация клеток в раковые и прогрессия онкологического процесса связаны с накоплением генетических и эпигенетических изменений в геноме, возникающих в результате нарушения нормального его функционирования [23, 24]. К генетическим изменениям относятся изменения последовательности нуклеотидов, включающие точечные мутации и хромосомные перестройки, такие как анеуплоидия, хромосомные аберрации, потеря гетерозиготности и нестабильность микросателлитов ДНК [23]. В основе большинства эпигенетических изменений при онкологических заболеваниях лежат нарушения метилирования ДНК, приводящие к изменению экспрессии генов [25, 26]. Анализ генетических и эпигенетических изменений, которые наблюдаются в процессе возникновения опухолевых клеток, с использованием современных молекулярно-генетических методов, представляется в настоящее время особенно перспективным для ранней онкодиагностики. Действительно, использование современных методов молекулярной биологии позволяет с высокой чувствительностью и селективностью выявлять характерные для раковых клеток изменения генома, что необходимо для разработки скрининга, ранней диагностики и мониторинга раковых заболеваний.

2.1. Генетические изменения.

Мутации генов являются одной из главных причин, лежащей в основе канцерогенеза, ведущей к активации протоонкогенов (K-Ras, β -катенин) или инактивации генов опухолевой супрессии (p53, APC, p16). В основном они возникают в результате замещения, инсерции, делеции нуклеотидов. На данный момент обнаружено небольшое количество генов, вносящих вклад в развитие рака желудка в результате мутаций. Наиболее исследованы при этом онкологическом заболевании гены p53, APC, β -катенина, K-Ras, BRAF [27].

Ген p53 - ген опухолевой супрессии. Продукт данного гена является модулятором транскрипции, специфически взаимодействует с ДНК, трансктивируя гены, являющиеся ингибиторами циклин-зависимых киназ и участвующих в апоптозе клеток. Мутации в гене p53 - самые часто встречающиеся при раке желудка. Большинство описанных мутаций преимущественно располагаются в 4-11 экзонах с горячими точками в кодонах 175, 248, 273, 282, 245, 213. Наиболее часто происходит замена пары гуанин-цитозин на аденин-тимин в CpG сайтах [28]. Частота выявления мутаций гена p53 в опухолевой ткани больных раком желудка варьирует от 0 до 77% [27-34]. Данные о корреляции между частотой мутирования гена p53 и клинико-патологическими характеристиками противоречивы. Согласно многим исследованиям, частота мутаций в гене p53 возрастает при локализации опухоли в кардиальном отделе по сравнению с дистальными отделами желудка [28, 31]. Ряд исследователей говорят о преобладании мутаций в данном гене при интестинальном типе рака [27, 35-37], другие подобной корреляции не находят [33, 38]. Имеется ряд наблюдений, что мутации в p53 чаще детектируются в метастазах, чем в очагах первичной опухоли рака. Выявлен высокий процент обнаружения мутированного гена p53 при высокой степени дисплазии, метаплазии эпителия желудка (до 67%) [28, 38]. С другой стороны, ряд авторов говорит о мутациях в p53 преимущественно на ранней стадии дисплазии [36, 39] и при хроническом гастрите, ассоциированном с *H. pylori* (52%) [40]. Подобные расхождения понижают специфичность метода диагностики рака желудка, основанного на детекции мутаций в гене p53.

Ген APC. Продукт гена обеспечивает пути деградации протоонкобелка β -катенина. Инактивация гена APC приводит к усилению транскрипции и увеличению времени жизни транскрипционного фактора β -катенина, который ведет к активации циклин-зависимых киназ, обуславливающих вхождение клетки

в фазу S клеточного цикла [41]. Изменения гена APC - ключевой момент в развитии рака толстой кишки (более 90% опухолей толстой кишки имеют изменения данного гена) [38]. У больных с заболеваниями желудка мутации гена APC чаще встречаются при доброкачественных заболеваниях (полипы желудка) (76%), чем при аденокарциноме (до 32,4%) [27, 30-32, 38, 42]. Следует отметить, что корреляции между частотой мутированного APC и степенью дисплазии/полипа желудка, а также между другими клинико-патологическими характеристиками не наблюдается.

Мутации в сопряженном с геном APC гене β -катенина при раке желудка в опухолевой ткани наблюдаются с частотой от 0-27% [42-45] и специфичны для злокачественного процесса. Park с соавторами отмечают корреляцию мутированного гена с интестинальным типом рака [44].

Ген K-ras принадлежит к семейству генов RAS [46]. Белки семейства RAS обладают GTPазной активностью и являются важным звеном в регуляции сигнальной трансдукции. При стимулировании клеток факторами роста активированный RAS белок стимулирует митоген-активированные белки киназного пути (RAS-RAF-MEK-ERK-MAP киназный путь), который играет важную роль в клеточной пролиферации и часто активирован в опухолевой клетке [46]. Мутации в гене K-ras могут приводить к появлению постоянно активированной GTP-связанной формы белка. Высокий процент точечных мутации в гене K-ras наблюдается при раке поджелудочной железы (70-100%), толстой кишки (7-80%), лёгкого (10-50%) [47, 48]. Частота встречаемости точечных мутаций гена K-ras при раке желудка в опухолевой ткани варьирует в диапазоне 0-28% [30, 46, 47-52]. При хронических гастритах, ассоциированных с *H. pylori*, в образцах ткани, взятой из патологического очага, также обнаруживаются мутации гена K-ras. Niyaма с соавторами обнаружили, что частота встречаемости мутаций этого гена в группе больных хроническим гастритом, ассоциированным с *H. pylori*, выше у больных, имеющих сопутствующее заболевание - рак желудка. [50]. Отмечается корреляция частоты мутаций гена K-ras с гистологическим типом опухоли (выше при дифференцированном типе рака) [50].

Ген Е-кадгерина (CDH1). Продукт гена относится к семейству кадхеринов - трансмембранных кальций-зависимых гликопротеинов. Наружная часть белка принимает участие в межклеточных контактах, осуществляя кальций-зависимую межклеточную адгезию. Его внутриклеточная часть связывается с β -катенином, вследствие чего β -катенин перестает функционировать в качестве трансактивирующего транскрипционного фактора. Генетические или эпигенетические изменения гена Е-кадгерина приводят к освобождению β -катенина и индукции его транскрипционной активности. [41]. В результате стимулируется размножение клеток, нарушаются межклеточные контакты, и увеличивается способность клеток к инвазии. Относительно высокая частота мутаций (28-56%) в гене Е-кадгерина наблюдается при наследственном диффузном раке желудка [36]. Однако в развитии спорадического рака желудка мутации данного гена не играют ключевой роли.

Было показано, что мутации в генах B-raf, BAD, ERHB2, часто обнаруживаемые при меланоме, колоректальном раке, практически не выявляются у больных раком желудка [46, 51, 53-55].

Одним из распространенных явлений, приводящих к опухолевому перерождению клетки, является **изменение числа копий последовательности ДНК**, которые выявляются методом сравнительной геномной гибридизации (CGH). В ходе этого метода одну ДНК-пробу получают из анализируемых тканей пациента, другую - из здоровых тканей. Далее пробы одновременно гибридизируют с хромосомами человека. Различия в результатах гибридизации позволяют выявить увеличение или уменьшение числа копий хромосомных районов в исследуемом образце. Этим методом можно обнаружить утраченные области генома размером около 10 млн. пар оснований [56]. Амплификация

(повышение числа копий) может быть обнаружена и в случае меньшего размера затронутых участков генома, но при условии большого числа повторов в этих участках. Отдельные гены становятся видимыми, если они амплифицированы 40 и более раз.

Показано, что увеличение количества tandemно-повторенных копий ДНК (за счёт амплификации, транслокации) стимулирует активацию соответствующего протоонкогена. Например, при раке желудка амплификация ДНК в областях хромосом 17q12, 10q26, 7q31, 8q23-24, 20q13, соответственно усиливает активность онкогенов ERBB2, K-SAM, C-MET, c-MYC, STK6 [37, 57].

Выявление амплифицированных участков различных хромосом при раке желудка позволяет выявить новые гены, повреждение которых приводит к онкотрансформации. Так, например, Kang с соавторами выяснили, что амплификация области 1p36.11-p33, включающей ген p73, и повышение экспрессии белка p73 коррелируют с прогрессированием опухоли [58]. При раке желудка были обнаружены многочисленные изменения числа копий последовательности ДНК в различных областях практически всех хромосом. Наибольший процент увеличения числа копий наблюдается в различных областях хромосом 1q (40%), 6p (85%), 8q (35%), 17 (35%), 19q (55%), 20q (40%) [58-64]. Данные о корреляции изменений с гистологическим типом опухоли, возрастом и полом больных раком желудка неоднозначны. Определение генов, соответствующих этим областям и их роли в развитии опухолевого процесса, - задача будущих исследований.

Потеря гетерозиготности (LOH) - это частное явление уменьшения числа копий последовательности ДНК в результате делеции одного из аллелей. Для детекции LOH используются полиморфные микросателлитные маркеры (микросателлитного анализа). Knudson было высказано предположение, что делеция одного из аллелей повышает вероятность онкотрансформации клетки за счет развития и проявления хромосомных изменений в другом аллеле [65]. Так, потеря областей хромосом 9p21, 5q21, 17p13, соответствующих генам опухолевой супрессии p16INK, APC, p53, соответственно, влечет за собой утрату функций данного гена [37, 58, 66].

Потеря гетерозиготности в опухолевых клетках позволяет осуществлять поиск генов опухолевой супрессии в утраченных районах. Например, ведётся поиск генов опухолевой супрессии, расположенных в области 8p21-23 [64, 67]. Потеря генетического материала в областях хромосом 1p (80%), 4q (75%), 5q (65%), 15q21 (65%), 21q (65%), 16q21 (45%) представляет собой обширное поле поиска генов, отсутствие которых приводит к возникновению рака желудка [58-61, 63, 64]. Имеются данные о корреляции подобных хромосомных изменений с клинико-патологическими параметрами больных раком желудка и выживаемостью. Обнаружено, что потеря участков в разных областях хромосом 4q, 14q коррелирует с развитием регионарных и отдаленных метастазов. Потеря генетического материала в 4q21.1 и 18q21 ассоциируется с плохим прогнозом болезни [58-60].

По данным ряда авторов, при раке желудка в результате LOH наблюдается потеря функции гена p53 в 26-83%, гена APC в 20%, TFF1 в 13-28%, CDH1-10% [28, 37, 68]. Попытки провести корреляцию LOH данных генов с клинико-патологическими параметрами весьма противоречивы. Ряд исследователей не наблюдают подобных корреляций, в то время как другие описывают потерю гетерозиготности гена p53 на поздних стадиях рака желудка, экзофитном росте и интестинальном типе опухоли [33], а гена p73 при высоко-дифференцированной аденокарциноме [69].

Как было сказано выше, потеря гетерозиготности детектируется с помощью полиморфных микросателлитных маркеров. Но, прежде всего, данные микросателлитного анализа позволяют обнаруживать широко распространённые при онкологических заболеваниях изменения в

микросателлитах. Микросателлиты - это высоко полиморфные многократно повторяющиеся последовательности, где единицей повтора является отрезок длиной от 1 до 6 пар нуклеотидов. Биологическая роль микросателлитов не изучена до конца, известно только, что геном человека содержит несколько тысяч микросателлитов и большинство из них расположены в некодирующей последовательности ДНК [48].

Первое предположение об участии микросателлитной ДНК в развитии онкологических заболеваний связано с обнаружением широко распространенных изменений полиА участков в геноме опухолевых клеток sporadического рака толстой кишки. Последующие исследования показали, что другие микросателлиты, включающие поли-СА повторы, имеют схожие изменения [23]. Данное явление получило название микросателлитной нестабильности (МН), то есть изменение числа одного или нескольких составляющих микросателлит повторов в результате делеции или амплификации. В настоящее время показано, что микросателлитная нестабильность связана с нарушением функционирования специфической системы репарации. В 1993 г. Strand с соавторами [70] первые на основе обнаружения микросателлитной нестабильности у бактерий с дефектом в генах системы репарации *mutS* или *mutL* высказали гипотезу о том, что данный фенотип возникает в результате повреждения системы репарации. Эта гипотеза была подтверждена после идентификации во 2 и 3 хромосомах человека гомологов *mutS*- *hMSH2* и *hMLH1* соответственно и обнаружения у близких родственников при наследственном неполипозном колоректальном раке инактивирующей мутации в данных генах. На сегодняшний день известно 6 гомологов *mutS* и *mutL*, инактивация которых в результате мутаций приводит к возникновению фенотипа микросателлитной нестабильности у раковых больных [23].

В случае обнаружения ошибок репликации в одном из пяти локусов микросателлитов говорят о низкой частоте микросателлитной нестабильности, в двух и более локусах микросателлитов - о высокой частоте МН.

Микросателлитная нестабильность высокой и низкой частоты встречается при раке желудка в 13-45% случаев [52, 55, 71-73]. Выводы о корреляции МН с клинико-патологическими и демографическими параметрами больных неоднозначны [37, 55]. Анализируя микросателлитную нестабильность, Vauhkonen с соавторами показали, что при диффузном типе рака желудка геном более стабилен, чем при интестинальном [61]. Это подтверждается рядом других работ [37, 42, 74]. В ряде работ МН низкой частоты была характерна для опухолей, локализованных в антральном отделе, и для других опухолей, характеризующихся низким инвазивным и метастатическим потенциалом в лимфатические сосуды [33, 52]. С другой стороны, An с соавторами [72] не нашли статистически значимой разницы между статусом МН и клинико-патологическими и демографическими параметрами больных, включая возраст, пол, расовую принадлежность пациентов. Lee с соавторами делают вывод, о том, что фенотип МН высокой частоты намного чаще встречается при полипе/дисплазии желудка, ассоциированной с карциномой (17%), по сравнению с полипом/дисплазией, не ассоциированной с карциномой (3%) [74]. Для МН низкой частоты подобной корреляции авторами не было отмечено.

Суммируя результаты многочисленных исследований, стоит отметить, что генетические изменения, выявленные при раке желудка на сегодняшний момент, не являются специфичными, и данные, представленные в этой области, весьма разрозненны и часто противоречивы. Однако, развитие современных методов исследования, таких как метод гибридизации ДНК на олигонуклеотидных чипах, полное геномное секвенирование [75, 76], позволяющих расширить и интенсифицировать сравнительный анализ генетических изменений в норме и патологии, вселяет большие надежды на то, что в обозримом будущем тканеспецифические ДНК маркеры будут выявлены и найдут применение в диагностике злокачественных новообразований.

2.2 Эпигенетические изменения.

Впервые явление гиперметилирования CpG-островков гена опухолевой супрессии при раке было описано для гена ретинобластомы (Rb) в 1989 г [77]. Но лишь в 1994 г после открытия механизма инактивации гена VHL путем метилирования обратили внимание на феномен гиперметилирования промоторных областей генов, как на причину инактивации генов при злокачественных новообразованиях. Стимулом для масштабирования исследований, направленных на исследование вклада этого эпигенетического процесса в онкотрансформацию, стало открытие основного пути инактивации генов за счет гиперметилирования CpG-островков промоторных областей генов на примере гена опухолевой супрессии p16. Большое значение для развития исследований метилирования ДНК имела разработка основных методологических подходов - метода бисульфитной модификации и полимеразной цепной реакции, специфичной к метилированию, которые просты в постановке и позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять метилированные области ДНК [77].

Использование aberrантно метилированных ДНК в качестве маркеров онкологического заболевания имеет ряд преимуществ по сравнению с вышеописанными генетическими изменениями ДНК. Во-первых, на сегодняшний день известно, что aberrантное метилирование ДНК является одним из наиболее распространенных и ранних событий, приводящих к опухолевой трансформации клетки [77]. Во-вторых, чувствительность детекции aberrантно метилированного гена в условиях избытка неметилированного аллеля выше, чем для мутантного аллеля [78]. В-третьих, описано большое число генов, инактивированных путем изменения статуса метилирования CpG-островков промоторных областей, характерных для онкотрансформированных клеток [77, 79].

В образцах ткани при онкологических и доброкачественных заболеваниях желудка был проанализирован профиль метилирования генов, участвующих в контроле клеточного цикла (p16, p15, APC, COX2, RASSF1A, Cyclin D2), в регуляции ангиогенеза (THBS1), ферментов репарации повреждений ДНК (MGMT, GSTP1, HMLH1), рецепторов, участвующих в передаче внешних сигналов (MDR1, RAR β 2), в межклеточных взаимодействиях и адгезии (E- и N-кадхерины) [80].

Ген p16 (CDKN2A, MTS1, INK4A) локализован на хромосоме 9p21 и кодирует белок-ингибитор циклин-зависимой киназы, который играет ключевую роль в контроле клеточного цикла путем фосфорилирования белка Rb. Отсутствие белка p16 ведет к тому, что циклин-зависимая киназа фосфорилирует белок ретинобластомы Rb, в результате чего из неактивного комплекса высвобождаются факторы транскрипции E2F, и активируются гены, обуславливающие вход клетки в S фазу клеточного цикла [81]. Известно, что изменение профиля метилирования гена p16 наблюдается, по разным данным, в 20-67% солидных опухолей человека разной локализации [81]. Метилированная форма гена p16 встречается в 10-80% образцов опухолевой ткани рака желудка [71, 82-94]. Процент гиперметилирования промоторной области этого гена при других заболеваниях желудка (хронический гастрит, полипы желудка) по данным ряда авторов варьирует от 0 до 15% [82, 85, 88-90]. При оценке диагностической значимости гиперметилированной формы гена p16 следует учитывать, что aberrантное метилирование выявляется в здоровой ткани желудка у 29% людей старше 45 лет [95].

Ген p15 (CDKN2B) расположен на хромосоме 9p21, так же, как и p16, и обладает высокой степенью гомологии с ним. Белок p15 подавляет активность циклин-зависимой киназы, специфически ингибируя каталитическую активность комплексов, образующихся между циклином D и циклин-зависимыми киназами. При исследовании биоптатов аденокарциномы желудка изменение профиля метилирования этого гена наблюдалось у 48-73,1% пациентов [82, 84, 86, 87, 92], в образцах тканей кишечной метаплазии ассоциированной и не ассоциированной

с раком желудка у 14% и 7% пациентов соответственно [82]. В других солидных опухолях гиперметилирование промоторной области гена p15 - событие редкое. При опухолях системы крови оно является главной причиной инактивации гена p15, например, метилирование промоторного участка гена присутствует в 70% случаев при острых миелоидных лейкозах [96]. Относительная лёгкость дифференциальной диагностики рака желудка и крови, а также высокий процент изменения статуса метилирования гена p15 при раке желудка позволяют рассматривать aberrантно метилированный промотор (локус AF 513858 область 1359-1375) гена p15 как потенциальный специфический онкомаркер рака желудка.

Ген APC. По данным ряда авторов, инактивация данного гена путём гиперметилирования промоторного участка при раке желудка наблюдалась в 61-84% случаев [68, 86, 88, 92, 94, 97]. Стоит отметить, что гиперметилированную форму гена обнаруживали не только в опухолевой ткани, но при неонкологических заболеваниях желудка [88, 92]. Kang с соавторами сообщают об увеличении процента гиперметилирования промоторного участка гена APC с возрастом [88]. В этом исследовании 15% образцов ткани слизистой оболочки желудка детей с диагнозом хронического гастрита показали изменение статуса метилирования CpG островков промоторной области гена APC, у взрослых до 50 лет данный показатель равнялся 65%. Очевидно, необходимы дополнительные исследования для оценки вклада изменения статуса метилирования гена APC в развитие доброкачественных и злокачественных новообразований желудка.

Ген COX-2 кодирует фермент циклооксигеназу-2 (COX-2), который принимает участие в синтезе простагландинов из арахидоновой кислоты. Экспрессия гена COX-2 индуцируется во всех тканях (за исключением коркового слоя почек и мозга) цитокинами, факторами роста и факторами, вызывающими рост опухоли. В ряде работ при раке толстой кишки и желудка отмечается уменьшение экспрессии COX-2, что является результатом изменения статуса метилирования как CpG-островков промоторной области гена COX-2, так и его 1 экзона [98]. Гиперметилированная форма гена COX-2 встречается у 4,1-46,3% больных раком желудка [73, 88, 89, 92, 99]. При доброкачественных заболеваниях желудка - в 1,4-8,8% случаев [88]. Как видно, частота встречаемости метилированной формы гена COX-2 варьирует в широких пределах, и для оценки вклада данного события в процесс канцерогенеза желудка необходимы дальнейшие исследования.

Ген RASSF1A - ген семейства белков RAS-ассоциированных доменов. Многочисленные исследования биологических функций гена RASSF1A показали, что белковый продукт этого гена участвует в регуляции клеточного цикла и апоптоза, снижает канцерогенность клеток опухолевых линий. Изменения данного гена часто встречаются при онкологических заболеваниях (при раке легкого, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки) [100]. По данным исследователей, метилированная форма гена RASSF1A при раке желудка выявляется в 26% случаев, и не обнаруживается в норме [82, 88, 89, 92, 100]. Относительно высокая специфичность выявления РЖ, основанного на детекции aberrантно метилированной формы гена RASSF1A, при низкой чувствительности позволяет рассматривать этот маркер как дополнительный в сочетании с другими маркерами, повышающими чувствительность диагностики.

Ген MGMT кодирует фермент (O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза), который принимает участие в репарации ДНК, удаляя алкильную группу в O⁶-позиции гуанина. Алкилирование ДНК в O⁶-позиции гуанина - важнейшее событие в трансформации клетки в опухолевую, которое при репликации ДНК приводит к замещению пары гуанин-цитозин на аденин-тимин в ДНК [101]. Инактивация гена MGMT в клетках большинства опухолей человека связана с гиперметилированием в норме неметилированных CpG-островков промоторной области этого гена [102]. При исследовании опухолевой ткани рака желудка

гиперметилирование CpG-островков гена MGMT наблюдалось в 18-61% случаев [34, 52, 73, 88, 92, 93, 101-104]. Отмечается увеличение частоты встречаемости метилированной формы гена MGMT при интестинальном типе рака по сравнению с диффузным [103] и корреляция с распространением опухолевой экспансии (вовлечением лимфатических узлов, стадией опухоли) [105]. Гиперметилирование промоторной области гена MGMT было обнаружено и у больных доброкачественными заболеваниями желудка [88, 92]. У здоровых доноров этот показатель варьировал в пределах 10,9-25% [89, 92]. Таким образом, аберрантное метилирование промоторной области (локус AL355531 46931-46953) этого гена является мало перспективным для диагностики рака желудка.

Ген hMLH1. Было показано, что белок, кодируемый этим геном, участвует в репарации неспаренных оснований, часто образующихся при репликации микросателлитных последовательностей ДНК [23]. Инактивация генов системы репарации в результате мутаций или гиперметилирования приводит к повышению частоты мутаций в микросателлитных последовательностях и, вероятно, в кодирующих последовательностях ДНК. Мутации гена hMLH1 лежат в основе наследственного неполипозного рака толстой и прямой кишки, а также микросателлитной нестабильности при спорадических формах колоректального рака, рака эндометрия и рака желудка [79]. Частота встречаемости изменений в статусе метилирования гена hMLH1 при раке желудка составляют, по разным данным, от 8,1 до 42% [34, 52, 68, 71-73, 82, 85-88, 90, 92, 93, 95, 97, 103, 104, 106]. При доброкачественных заболеваниях желудка изменение статуса метилирования этого гена выявлено с меньшей частотой [82, 85, 88-90]. В биоптатах здоровой ткани желудка и при хронических гастритах метилированной формы гена hMLH1 не обнаружено [34, 95, 97], что позволяет использовать анализ метилирования гена hMLH1 в диагностике рака желудка.

Ген GSTP1 кодирует фермент глутатион-S-трансферазу (GST) пи-класса. Глутатион-S-трансферазы (GST) принимают участие в метаболизме ксенобиотиков, катализируя реакции конъюгации восстановленного глутатиона с электрофильными субстратами, что приводит к детоксикации этих веществ. Нарушение этого процесса может послужить одной из основной причин опухолевой трансформации клетки. Прекращение транскрипции GSTP1 в результате избыточного метилирования CpG островков в промоторной области гена в соматических клетках почти всегда сопутствует раку простаты (в 90% случаев). При раке эндометрия изменения статуса метилирования данного гена обнаруживается у 80% больных [107]. При раке желудка вне зависимости от возраста пациентов гиперметилирование промоторной области гена GSTP1 было обнаружено у 7-37,5% больных и не было обнаружено в биоптатах, полученных от пациентов с кишечной метаплазией и хроническим гастритом [68, 82, 84, 86-89, 104]. Таким образом, анализ статуса метилирования гена GSTP1 с целью диагностики рака желудка имеет смысл только в комбинации с другими маркерами, повышающими специфичность метода.

Ген TIMP-3. Продукт этого гена - один из представителей TIMP семейства, кодирующего тканевые ингибиторы металлопротеиназ (TIMP). Матриксные металлопротеиназы (ММП) - ферменты, гидролизующие белки внеклеточного матрикса. ММП-3 расщепляет молекулу матрикса декорина, высвобождая фактор роста- β в биологически активной форме, который активирует пролиферацию клеток и способствует образованию/росту опухоли. Инактивация гена TIMP-3 является важным фактором опухолевой прогрессии и метастазирования [108, 109]. Гиперметилирование промоторной области этого гена у больных раком желудка обнаруживается у 12,5-65% больных [68, 86, 88, 90, 92]. Этот маркер встречается при хроническом гастрите, метаплазии, полипах желудка и у здоровых людей, причем с возрастом аберрантно метилированная форма этого гена встречается чаще [89-91]. Эти данные указывают на то, что метилированная форма гена TIMP-3 не может рассматриваться в качестве маркера рака желудка.

Ген DAP-киназы - кодирует кальмодулин-зависимую киназу серин-треонинового типа. DAP-киназа содержит в своей структуре домен клеточной смерти (death domain), который в присутствии γ -интерферона запускает каскад реакций, ведущих к апоптозу. Снижение уровня экспрессии DAP-киназы за счёт гиперметилирования промоторной области приводит к увеличению метастатического потенциала опухоли [110]. При раке желудка изменение статуса метилирования этого гена наблюдается в большом проценте случаев (34-70%) [68, 82, 84, 88, 90, 111, 112], однако, обнаруживается в норме и при хроническом гастрите, полипах и интестинальной метаплазии [88-90]. Была отмечена корреляция изменения статуса метилирования гена с возрастом [112], распространенностью процесса и 5-летней выживаемостью. При наличии метастазов, на 3-4 стадии заболевания процент гиперметилированной формы гена DAP-киназы возрастал, что позволяет рассматривать ген DAP-киназы как потенциальный маркер распространенности болезни и прогноза [111].

Ген E-кадгерина. Как было сказано выше, ген E-кадгерина кодирует белок, относящийся к семейству кадхеринов - трансмембранных кальций-зависимых гликопротеинов. Экспрессия гена E-кадгерина подавляется в результате мутаций и метилирования промоторных областей гена. Частота встречаемости метилированной формы гена E-кадгерина при раке желудка варьирует от 15 до 80% [71, 73, 82, 84, 86-89, 92, 93, 113, 114]. Стоит отметить, что при хронических и доброкачественных заболеваниях желудка этот показатель также составляет 58,2-85% [82, 88, 92], причем частота встречаемости метилированной формы гена увеличивается с возрастом [95], что делает этот маркер непригодным для диагностики рака желудка.

Ген THBS1 - ген, кодирующий ингибитор ангиогенеза - тромбоспондин-1 (TSP). TSP - это гликопротеин, расположенный во внеклеточном матриксе различных тканей. Он принимает участие в процессе агрегации тромбоцитов, регулирует адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Снижение экспрессии THBS способствует опухолевой прогрессии, влияя на ангиогенез, инвазию и миграцию опухолевых клеток [115]. У больных раком желудка промоторная область этого гена метилирована в 30-60% случаев [68, 88, 90, 92], у больных хроническим гастритом в 10-18% [88, 90, 92], в биоптатах нормальной ткани желудка частота встречаемости метилированной формы гена составляет от 0 до 37% [89, 92]. Очевидно, изменение статуса метилирования гена THBS1 не является ключевым событием в развитии рака желудка.

Как видно из приведенных данных, результаты разных исследований по выявлению частоты встречаемости одних и тех же метилированных маркеров отличаются. Это может быть связано с различной чувствительностью и специфичностью анализа, что обусловлено использованием различных вариантов ПЦР-анализа (качественный, разновидности количественного, с использованием рестриктаз, и т.д.). Различия могут быть связаны с тем, что профиль метилирования CG пар промоторов генов опухолевой супрессии может отличаться как в опухолях одной ткани у разных людей, так и между опухолями разных органов. Например, при раке простаты и молочной железы метилирована промоторная область гена RAR β 2, а при раке легкого область первого экзона этого гена [116]. Поэтому для успешной разработки тканеспецифичных анализов на метилированные маркеры опухолевого процесса актуальной проблемой остается выявление конкретных сайтов метилирования в ДНК, выделенной из опухолей разных пациентов. Такой анализ позволит сделать более специфичным выбор анализируемых участков гена для ПЦР-диагностики опухолей желудка. Существенный вклад может внести использование количественного анализа уровня метилирования при помощи количественного ПЦР-анализа. Использование этого метода позволит оценить базовые уровни метилирования и, возможно, выявить отличия между злокачественными и доброкачественными опухолями.

3. ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ДНК.

Описанное в предыдущем разделе исследование молекулярно-генетических маркеров было выполнено на образцах опухолевых тканей, полученных при помощи биопсии или после операции. Однако, проведение биопсии возможно лишь при визуально детектируемой опухоли, и, таким образом, этот метод не может быть использован ни для выявления ранних стадий развития опухолей, ни для мониторинга рецидивов. Наиболее перспективным представляется неинвазивное выявление онкомаркеров путем анализа биологических жидкостей, таких как кровь, моча, бронхоальвеолярный смыв, внутрипротоковая жидкость и другие [48, 107]. Разработка таких методов анализа стала возможной сравнительно недавно, когда было обнаружено, что свободные циркулирующие ДНК (цирДНК) присутствуют в плазме крови у здоровых людей, а при некоторых заболеваниях (аутоиммунные патологии, диабет, травмы, опухоли) содержание ДНК в плазме даже заметно возрастает [48, 117]. Особенный интерес вызвал тот факт, что в цирДНК крови больных выявляются изменения (генетические и эпигенетические), идентичные изменениям ДНК в клетках опухоли [117]. Однако, в большинстве случаев частота выявления молекулярно-генетических маркеров в плазме крови больных раком значительна ниже по сравнению с частотой их выявления в образцах опухолевой ткани [48].

Были предприняты попытки поиска молекулярно-генетических и эпигенетических маркеров в составе циркулирующих ДНК крови больных раком желудка. Wang с соавторами обнаружили мутации генов p53, APC в образцах сыворотки крови 59% больных раком желудка, у которых эти же мутации были обнаружены в опухолевой ткани [32]. Lee с соавторами [84] сравнивали частоту выявления метилированного гена p15 в опухолевой ткани и в пуле ДНК, выделенной из сыворотки крови. В образцах ткани 68% больных было обнаружено гиперметилирование промоторной области гена, а у 81% больных из этой группы аналогичные изменения были обнаружены и в ДНК сыворотки.

При сравнении статуса метилирования гена p16 в биоптатах и в сыворотке исследователи обнаружили метилирование в сыворотке только у 26% пациентов, в биоптатах которых было обнаружено искомое метилирование гена p16 [118].

На основании исследования метилирования генов APC, E-кадгерина, hMLH1, TIMP-3 в сыворотке и соответствующих образцах ткани аденокарциномы желудка Leung с соавторами пришли к выводу, что детекция гиперметилированной формы гена в сыворотке позволяет со 100% уверенностью говорить о присутствии этого же изменения в соответствующей опухолевой ткани [86].

Как было показано в недавних исследованиях, внеклеточные ДНК не только свободно циркулируют в плазме крови, но также связаны с поверхностью форменных элементов крови. Связанные с поверхностью форменных элементов крови цирДНК составляют основную часть цирДНК крови здоровых доноров (более 90%), а при опухолях различной локализации наблюдается изменение соотношения между свободными цирДНК плазмы и связанными с клеточной поверхностью цирДНК [119]. Следует также отметить, что в составе цирДНК, связанных с клеточной поверхностью, как и в ДНК плазмы, обнаруживаются онкоспецифические последовательности ДНК [120]. Использование в ПЦР суммарной внеклеточной ДНК крови позволяет существенно повысить чувствительность анализа метилирования генов опухолевой супрессии. Было показано, что гиперметилированная форма генов RAR β 2, RASSF1A, hIC-1 выявляется в ДНК плазмы крови у 15-55% больных раком молочной железы, а в суммарной ДНК у 65-90% больных [121]. Эти данные позволяют надеяться, что проблема более низкой частоты детекции молекулярно-генетических маркеров в крови по сравнению с исследованием опухолевой ткани при раке желудка может быть успешно преодолена.

В настоящее время с успехом проводятся исследования онкоспецифических последовательностей во внеклеточных ДНК других биологических жидкостей при

онкологических заболеваниях различной локализации. Большую часть всех злокачественных новообразований человека составляют опухоли, происходящие из выстилающего полости тела эпителия. Слушиваясь, опухолевые клетки попадают в просвет соответствующего органа и выводятся из организма. Таким образом, выявление в естественных выделениях организма специфических ДНК-маркеров является чувствительным способом диагностики и мониторинга опухолей соответствующего органа. При раке толстой и прямой кишки проводится анализ кала, при раке поджелудочной железы исследуется ДНК секрета поджелудочной железы, при раке предстательной железы и мочевого пузыря ДНК мочи [48]. При раке желудка подобные исследования не нашли широкого распространения. Очевидно, это связано с трудностями забора и ограниченным выделением в естественные биологические жидкости необходимого для анализа материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Несмотря на успехи, достигнутые в развитии молекулярно-диагностических методов онкодиагностики, в диагностике рака желудка остаются нерешенными вопросы, связанные с повышением чувствительности и специфичности этих методов. Большинство генетических и эпигенетических изменений, перечисленных в обзоре генов, имеют место не только при раке желудка, но и при незлокачественных заболеваниях. До сих пор не ясно, могут ли молекулярно-генетические (и эпигенетические) маркеры, обнаруженные в доброкачественных новообразованиях, свидетельствовать о возможном злокачественном перерождении опухоли. Необходим анализ корреляции генетических и эпигенетических модификаций с возрастом, поскольку существуют данные о накоплении таких изменений со временем. По-видимому, необходим дальнейший поиск генов, избирательно задействованных в развитии рака желудка.

Тем не менее, очевидна перспективность развития молекулярно-генетических методов анализа и направления, которые позволят повысить их диагностическую ценность. Использование суммарных циркулирующих ДНК крови, повышение чувствительности и специфичности ПЦР-анализа за счет детекции продукта реакции в реальном времени, совместное использование нескольких маркеров, долговременные исследования, направленные на выявления корреляций обнаруженных маркеров с развитием опухолей, вполне вероятно позволят в ближайшее время создать востребованные в практической медицине диагностические тесты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Parkin M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.* (2005) *CA Cancer J. Clin.*, **55**, 74–108.
2. *Мерабишвили В.М.* (2001) *Практическая онкология*, **3**(7), 3-8.
3. *Аксель Е.М., Давыдов М.И.* (2002) Злокачественные новообразования в России и странах СНГ в 2000 г. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва, 85-106.
4. *Симонов Н.Н., Мяскина Л.М., Филлин А.В., Рыбалкин Ю.И.* (2001) *Практическая онкология*, **3**(7), 25-30.
5. *Белохвостов А.С., Румянцев А.Г.* (2003) *Онкомаркеры*, М.
6. *Tocchi A., Costa G., Lepre L., Liotta G., Mazzoni G., Cianetti A., Vannini P.* (1998) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **124**, 450-455.
7. *Takahashi Y., Takeuchi T., Sakamoto J., Touge T., Mai M., Ohkura H., Kodaira S., Okajima K., Nakazato H., Committee M.* (2003) *Gastric Cancer*, **6**, 142-145.
8. *Guadagni F., Roselli M., Amato T., Cosimelli M., Perri P., Casale V., Carlini M., Santoro E., Cavaliere R., Greiner J.W., Schlom J.* (1992) *Cancer Res.*, **52**, 1222-1227.
9. *Guadagni F., Roselli M., Amato T., Cosimelli M., Mannella E., Perri P., Abbolito M.R., Cavaliere R., Colcher D., Greiner J.W., Schlom J.* (1991) *Cancer*, **68**, 2443-2450.
10. *Mattar R., Alves e Andrade C.R., DiFavero G.M., Gama-Rodrigues J.J., Laudanna A.A.* (2002) *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo*, **57**, 89-92.

11. *Ychou M., Duffour J., Kramar A., Gourgou S., Grenier J.* (2000) *Disease Markers*, **16**(3-4), 105-110.
12. *Tachibana M., Takemoto Y., Nakashima Y., Kinugasa S., Kotoh T., Dhar D.K., Kohno H., Nagasue N.* (1998) *J. Am. Coll. Surg.*, **187**, 64-68.
13. *Gaspar M.J., Arribas I., Coca M.C., Diez-Alonso M.* (2001) *Tumor Biol.*, **22**, 318-322.
14. *Marrelli D., Roviello F., De Stefano A., Farnetani M., Garosi L., Messano A., Pinto E.* (1999) *Oncology*, **5**, 55-62.
15. *Choi S.R., Jang J.S., Lee J.H., Roh M.H., Kim M.C., Lee W.S., Qureshi W.* (2006) *Dig. Dis. Sci.*, **51**, 2081-2086.
16. *Marrelli D., Pinto E., De Stefano A., Farnetani M., Garosi L., Roviello F.* (2001) *Am. J. Surgery*, **181**, 16-19.
17. *Bergstrand C.G., Czar D.* (1956) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **8**, 174.
18. *Inagawa S., Shimazaki J., Hori M., Yoshimi F., Adachi S., Kawamoto T., Fukao K., Itabashi M.* (2001) *Gastric Cancer*, **4**, 43-52.
19. *Kono K., Amemiya H., Sekikawa T., Iizuka H., Takahashi A., Fujii H., Matsumoto Y.* (2002) *Dig. Surg.*, **19**, 359-365.
20. *Goonetilleke K.S., Siriwardena A.K.* (2007) *EJSO*, **33**, 266-270.
21. *Tas F., Aykan N.F., Aydiner A., Yasasever V., Topuz E.* (2001) *Am. J. Clin. Oncol.*, **24**(2), 148-149.
22. *Duraker N., Celik A.N., Gencler N.* (2002) *EJSO*, **28**, 844-849.
23. *Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.* (1998) *Nature*, **396**, 643-649.
24. *Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A.* (2004) *Nature*, **429**, 457-463.
25. *Herman J.G., Baylin S.B.* (2003) *N. Engl. J. Med.*, **349**, 2042-2054.
26. *Esteller M.* (2002) *Oncogene*, **21**, 5427-5440.
27. *Hamilton J.P., Meltzer S.J.* (2006) *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **4**, 416-425.
28. *Fenoglio-Preiser C.M., Wang J., Stemmermann G.N., Noffsinger A.* (2003) *Human Mutation*, **21**, 258-270.
29. *Kusano M., Toyota M., Suzuki H., Akino K., Aoki F., Fujita M., Hosokawa M., Shinomura Y., Imai K., Tokino T.* (2006) *Cancer*, **106**, 1467-1479.
30. *Tajima Y., Yamazaki K., Makino R., Nishino N., Aoki S., Kato M., Morohara K., Kaetsu T., Kusano M.* (2006) *Clin. Cancer Res.*, **12**, 6469-6479.
31. *Tajima Y., Yamazaki K., Makino R., Nishino N., Masuda Y., Aoki S., Kato M., Morohara K., Kusano M.* (2007) *Br. J. Cancer*, **96**, 631-638.
32. *Wang J-Y., Hsieh J-S., Chen C-C., Tzou W-S., Cheng T-L., Chen F-M., Huang T-J., Huang Y-S., Huang S-Y., Yang T., Lin S-R.* (2004) *J. Surgical Res.*, **120**, 242-248.
33. *Juvan R., Hudler P., Gazvoda B., Repse S., Bracko M., Komel R.* (2007) *Croat Med. J.*, **48**, 207-217.
34. *Oue N., Mitani Y., Motoshita J., Matsumura S., Yoshida K., Kuniyasu H., Nakayama H., Yasui W.* (2006) *Cancer*, **106**, 1250-1259.
35. *Lu C., Xu H-M., Ren Q., Ao Y., Wang Z-N., Ao X., Jiang L., Luo Y., Zhang X.* (2003) *World J. Gastroenterol.*, **9**, 2662-2665.
36. *El-Rifai W., Powell S.M.* (2002) *Semin. Radiat. Oncol.*, **12**(2), 128-140.
37. *Vauhkonen M., Vauhkonen H., Sipponen P.* (2006) *Best. Practice and Research Clinical Gastroenterology*, **20**, 651-674.
38. *Zheng L., Wang L., Ajani J., Xie K.* (2004) *Gastric Cancer*, **7**, 61-77.
39. *Shiao Y.H., Rugge M., Correa P., Lehmann H.P., Scheer W.D.* (1994) *Am. J. Pathol.*, **144**, 511-517.
40. *Murakami K., Fujioka T., Okimoto T., Mitsuishi Y., Oda T., Nishizono A., Nasu M.* (1999) *Scand. J. Gastroenterology*, **34**, 474-477.
41. *Копнин Б.П.* (2000) *Биохимия*, **65**, 5-33.
42. *Lee J-H., Abraham S.C., Kim H-S., Nam J-H., Choi C., Lee M-C., Park C-S., Juhng S-W., Rashid A., Hamilton S.R., Wu T-T.* (2002) *Am. J. Pathol.*, **161**, 611-618.
43. *Woo D.K., Kim H.S., Lee H.S., Kang Y.H., Yang H.K., Kim W.H.* (2001) *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, **95**, 108-113.
44. *Park W.S., Oh R.R., Park J.Y., Lee S.H., Shin M.S., Kim Y.S., Kim S.Y., Lee H.K., Kim P.J., Oh S.T., Yoo N.J., Lee J.Y.* (1999) *Cancer Res.*, **59**, 4257-4260.

45. *Werner M., Becker K.F., Keller G., Hoefler H. J* (2001) *Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127**, 207-216.
46. *Lee S.H., Lee J.W., Soung Y.H., Kim H.S., Park W.S., Kim S.Y., Lee J.H., Park J.Y., Cho Y.G., Kim C.J., Nam S.W., Kim S.H., Lee J.Y., Yoo N.J.* (2003) *Oncogene*, **22**, 6942-6945.
47. *Kimura K., Nagasaka T., Hoshizima N., Sasamoto H., Notohara K., Takeda M., Kominami K., Iishii T., Tanaka N., Matsubara N.* (2007) *J. Intern. Med. Res.*, **35**, 450-457.
48. *Fleischhacker M., Schmidt B.* (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 181-232.
49. *Arber N., Shapira I., Ratan J., Stern B., Hibshoosh H., Moshkowitz M., Gammon M., Fabian I., Halpern Z.* (2000) *Gastroenterology*, **118**, 1045-1050.
50. *Hiyama T., Haruma K., Kitadai Y., Masuda H., Miyamoto M., Tanaka S., Yoshihara M., Shimamoto F., Chayama K.* (2002) *Int. J. Cancer*, **97**, 562-566.
51. *Kim I-J., Park J-H., Kang H.-C., Shin Y., Park H-W., Park H-R., Ku J-L., Lim S-B., Park J-G.* (2003) *Hum. Genet.*, **114**, 118-120.
52. *Wu M., Semba S., Oue N., Ikehara N., Yasui W., Yokozaki H.* (2004) *Gastric Cancer*, **7**, 246-253.
53. *Jeong E.G., Lee S.H., Kim S.S., Ahn C.H., Yoo N.J., Lee S.H.* (2007) *APMIS*, **115**, 976-981.
54. *Song J.H., Kim C.J., Cho Y.G., Kwak H.J., Nam S.W., Yoo N.J., Lee J.Y., Park W.S.* (2007) *APMIS*, **115**, 802-808.
55. *Sasao S., Hiyama T., Tanaka S., Yoshihara M., Yasui W., Chayama K.* (2006) *Oncology Reports*, **16**, 11-15.
56. *Рубцов Н.Б.* (2006) Методы работы с хромосомами млекопитающих, Редакционно-издательский центр НГУ, Новосибирск.
57. *Gorringe K.L., Boussioutas A., Bowtell D.D.L.* (2005) *Genes, Chromosomes and Cancer*, **45**, 247-259.
58. *Kang J.U., Kang J.J., Kwon K.C., Park J.W., Jeong T.E., Noh S.M., Koo S.H.* (2006) *J. Korean Med. Sci.*, **21**, 656-665.
59. *Kimura Y., Noguchi T., Kawahara K., Kashima K., Daa T., Yokoyama S.* (2004) *Modern Pathology*, **17**, 1328-1337.
60. *Weiss M.M., Kuipers E.J., Postma C., Snijders A.M., Pinkel D., Meuwisswn S.G.M., Albertson D., Meijer G.A.* (2004) *Cellular Oncology*, **26**, 307-317.
61. *Vauhkonen H., Vauhkonen M., Sajantila A., Sipponen P., Knuutila S.* (2006) *Cancer Genet. Cytogenet.*, **167**, 150-154.
62. *Qi W., Baiqiu W., Xinyuan G., Hui G., Hui C., Qifan Z., Chengbin H., Pu L., Songbin F.* (2003) *Chin. Med. J.*, **116**(4), 517-523.
63. *Buffart T.E., Carvalho B., Hopmans E., Brehm V., Kranenbarg E.K., Schaaaj-Visser T.B.M., Eijk P.P., van Grieken N.C.T., Ylstra B., van de Velde C.J.H., Meijer G.A.* (2007) *J. Pathol.*, **211**, 54-51.
64. *Baffa R., Santoro R., Bullrich F., Mandes B., Ishii H., Croce C.M.* (2000) *Clin. Cancer Res.*, **6**, 1372-1377.
65. *Knudson A.G.* (2001) *Nature Reviews*, **1**, 157-162.
66. *Fringes B., Mayhew T.M., Reith A., Gates J., Ward D.C.* (2000) *Lab. Invest.*, **80**, 1501-1508.
67. *Hosseini H.A., Ahani A., Galehdari H., Froughmand A.M., Hosseini M., Masjedizadeh A., Zali M.R.* (2007) *World J. Gastroenterol.*, **13**, 3354-3358.
68. *Kim H.C., Kim J.C., Roh S.A., Yu C.S., Yook J.H., Oh S.T., Kim B.S., Park K.C., Chang R. J.* (2005) *Cancer Res. Clin. Oncol.*, **131**, 733-740.
69. *Yasui W., Oue N., Kuniyasu H., Ito R., Tahara E., Yokozaki H.* (2001) *Gastric Cancer*, **4**, 113-121.
70. *Strand M., Prolla T.A., Liskay R.M., Petes T.D.* (1993) *Nature*, **365**, 274-276.
71. *Suzuki H., Itoh F., Toyota M., Kikuchi T., Kakiuchi H., Hinoda Y., Imai K.* (1999) *Int. J. Cancer*, **83**, 309-313.
72. *An C., Choi I-S., Yao J.C., Worah S., Xie K., Mansfield P.F., Ajani J.A., Rashid A., Hamilton S. R., Wu T-T.* (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**, 656-663.

73. *Carvalho B., Pinto M., Cirnes L., Oliveira C., Machado J.C., Suriano G., Hamelin R., Carneiro F., Seruca R.* (2003) *Eur. J. Cancer*, **39**, 1222-1227.
74. *Lee H.S., Choi S.I., Lee H.K., Kim H.S., Yang H-K., Kang G.H., Kim Y.I., Lee B.L., Kim W.H.* (2002) *Mod. Pathol.*, **15**, 632-640.
75. *Greenman C., Stephens P., Smith R., Dalgliesh G.L., Hunter C., Bignell G., Davies H., Teague J., Butler A., Stevens C., Edkins S. et al.* (2007) *Nature*, **446**, 153-158.
76. *Sjoblom T., Jones S., Wood L.D., Parsons D.W., Lin J., Barber T.D., Mandelker D., Lin J., Leary R.J., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Buckhauits P., Farrell C. et al.* (2006) *Science*, **314**, 268-274.
77. *Esteller M.* (2005) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 629-656.
78. *Herman J.G., Graff J.R., Myoehaenen S., Nelkin B.D., Baylin S.B.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9821-9826.
79. *Herman J.G.* (1999) *Semin. Cancer Biol.*, **9**, 359-367.
80. *Choi I-S., Wu T-T.* (2005) *Cell Res.*, **15**, 247-254.
81. *Лухтеништейн А.В., Киселева Н.П.* (2001) *Биохимия*, **66**, 293-317.
82. *To K-F., Leung W.K., Lee T-L., Yu J., Tong J.H.M., Chan M.W.Y., Ng E.K.W., Chung S.C.S., Sung J.J.Y.* (2002) *Int. J. Cancer*, **102**, 623-628.
83. *Hou P., Ji M-J., Shen J-Y., He N-Y., Lu Z-H.* (2005) *Biochemical Genet.*, **43**, 1-9.
84. *Lee T-L., Leung W.K., Chan M.W.Y., Ng E.K.W., Tong J.H.M., Lo K-W, Chung S.C.S., Sung J.J.Y., To K-F.* (2002) *Clin. Cancer Res.*, **8**, 1761-1766.
85. *Lee J-H., Park S-J., Abraham S.C., Seo J-S., Nam J-H., Choi C., Juhng S-W., Rashid A., Hamilton S.R., Wu T-T.* (2004) *Oncogene*, **23**, 4646-4654.
86. *Leung W.K., To K-F., Chu E.S.H., Chan M.W.Y., Bai A.H.C., Ng E.K.W., Chan F.K.L., Sung J.J.Y.* (2005) *Brit. J. Cancer*, **92**, 2190-2194.
87. *Leung W.K., Yu J., Ng E.K.W., To K. F., Ma P.K., Lee T.L., Go M.Y.Y., Chung S.C.S., Sung J.J.Y.* (2001) *Cancer*, **91**, 2294-2301.
88. *Kang G. H., Lee S., Kim J-S., Jung H-Y.* (2003) *Laboratory Investigation*, **83**, 635-641.
89. *Kang G.H., Lee H.J., Hwang K.S., Lee S.* (2003) *Am. J. Pathol.*, **163**, 1551-1556.
90. *Kang G.H., Shim Y-H., Jung H-Y., Kim W. H., Ro J.Y., Rhyu M-G.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 2847-2851.
91. *Koike H., Ichikawa D., Ikoma H., Otsuji E., Kitamura K., Yamagishi H.* (2004) *J. Surgical Oncology*, **87**, 182-186.
92. *Sato F., Meltzer S.J.* (2006) *Cancer*, **106**, 483-493.
93. *Oue N., Oshimo Y., Nakayama H., Ito R., Yoshida K., Matsusaki K., Yasui W.* (2003) *Cancer Sci.*, **94**, 901-905.
94. *Sarbia M., Geddert H., Klump B., Kiel S., Iskender E., Gabbert H.E.* (2004) *Int. J. Cancer*, **111**, 224-228.
95. *Waki T., Tamura G., Tsuchiya T., Sato K., Nishizuka S., Motoyama T.* (2002) *Am. J. Pathol.*, **161**, 399-403.
96. *Paz M.F., Fraga M.F., Avila S., Guo M., Pollan M., Herman J.G., Esteller M.* (2003) *Cancer Res.*, **63**, 1114-1121.
97. *Waki T., Tamura G., Sato M., Motoyama T.* (2003) *Oncogene*, **22**, 4128-4133.
98. *Song S.H., Jong H-S., Choi H.H., Inoue H., Tanabe T., Kim N.K., Bang Y-J.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 4628-4635.
99. *Kikuchi T., Itoh F., Toyota M., Suzuki H., Yamamoto H., Fujita M., Hosokawa M., Imai K.* (2002) *Int. J. Cancer*, **97**, 272-277.
100. *Donninger H., Vos M.D., Clark G.J.* (2007) *J. Cell Sci.*, **120**, 3163-3172.
101. *Oue N., Shigeishi H., Kuniyasu H., Yokozaki H., Kurauka K., Ito R., Yasui W.* (2001) *Int. J. Cancer*, **93**, 805-809.
102. *Esteller M., Hamilton S.R., Burger P.C., Baylin S.B., Herman J.G.* (1999) *Cancer Res.*, **59**, 793-797.
103. *Oue N., Sentani K., Yokozaki H., Kitadai Y., Ito R., Yasui W.* (2001) *Pathobiology*, **69**, 143-149.
104. *Hong S. H., Kim H.G., Chung W.B., Kim E.Y., Lee J.Y., Yoon S.M., Kwon J.G., Sohn Y.K., Kwak E.K., Kim J.W.* (2005) *J. Korean Med. Sci.* **20**, 236-241.

105. Park T.J., Han S.-U., Cho Y.-K., Paik W.K., Kim Y.B., Lim I.K. (2001) *Cancer*, **92**, 2760-2768.
106. Geddert H., Kiel S., Iskander E., Florl A.R., Krieg T., Vossen S., Gabbert H.E., Sarbia M. (2004) *Int. J. Cancer*, **110**, 208-211.
107. Брызгунова О.Е., Власов В.В., Лактионов П.П. (2007) *Биомед. химия*, **53**, 128-139.
108. Kang S.H., Choi H.H., Kim S.G., Jong H.-S., Kim N.K., Kim S.-J., Bang Y.-J. (2000) *Int. J. Cancer*, **86**, 632-635.
109. McCawley L.J., Matrisian L.M. (2000) *Molecular Medicine Today*, **60**, 149-156.
110. Raveh T., Kimichi A. (2001) *Exper. Cell Res.*, **264**, 185-192.
111. Chan A.W.H., Chan M.W.Y., Lee T.-L., Ng E.K.W., Leung W.-K., Lau J.Y.W., Tong J.H.M., Chan F.K.L., To K.-F. (2005) *Oncol. Reports*, **13**, 937-941.
112. Waki T., Tamura G., Sato M., Terashima M., Nishizuka S., Motoyama T. (2003) *Cancer Sci.*, **94**, 360-364.
113. Graziano F., Arduini F., Ruzzo A., Bearzi I., Humar B., More H., Silva R., Muretto P., Guilford P., Testa E., Mari D., Magnani M., Cascinu S. (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 2784-2789.
114. Graziano F., Arduini F., Ruzzo A., Mandolesi A., Bearzi I., Silva R., Muretto P., Testa P.E., Mari D., Magnani M., Scartozzi M., Cascinu S. (2004) *Ann. Oncol.*, **15**, 489-492.
115. Ren B., Yee K.O., Lawler J., Khosravi-Far R. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1765**, 178-188.
116. Virmani A.K., Rath A., Zuchbauer-Möller S., Sacchi N., Fukuyama Y., Bryant D., Maitra A., Heda S., Fong K.M., Thunnissen F., Minna J.D., Gazdar A.F. (2000) *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 1303-1307.
117. Anker P., Mulcahy H., Stroun M. (2003) *Int. J. Cancer*, **103**, 149-152.
118. Kanyama Y., Hibi K., Nakayama H., Kadera Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A. (2003) *Cancer Sci.*, **94**, 418-420.
119. Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Rykova E.Y., Permyakova V.I., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2005) *Clin. Chem.*, **51**, 1317-1319.
120. Rykova E.Y., Skvortsova T.E., Laktionov P.P., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. (2004) *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **23**, 855-859.
121. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2006) *Brit. J. Cancer*, **94**, 1492-1495.

Поступила: 06. 02. 2008.

IMMUNOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC MARKERS IN GASTRIC CANCER DIAGNOSTICS

E.V. Elistratova¹, P.P. Laktionov¹, P.I. Shelestuk², S.A. Tuzikov³, V.V. Vlassov¹, E.Y. Rykova¹

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, pr. Lavrentiev 8, Novosibirsk, 630090 Russia, tel.: (383)3304654, fax: (383)3333677; e-mail: alenakol@mail.ru

²Novosibirsk Oncological Dispensary, ul. Plachotnogo 2, Novosibirsk, 630108 Russia

³Cancer Research Institute, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, per. Kooperativnii 5, Tomsk, 634009 Russia.

Studies of molecular mechanisms of neoplastic transformation are being under the thorough investigation, reveal the new genes involved into the tumor development. These genes and their products are potential tumor markers and levels of their expression can be detected using modern assays characterized by high specificity and sensitivity. The review highlights the current status of the molecular diagnostics of gastric cancer, including protein and nucleic acids biomarkers. The genetic and epigenetic changes, which are detected in the malignant and nonmalignant tumor tissue DNA and in the blood plasma DNA from tumor bearing patients, are summarized.

Key words: gastric cancer, diagnostics, tumor markers, circulating DNA.