

сти степени злокачественности ГИСО различной локализации от изучаемых генетических нарушений.

Материалы и методы: В исследование было включено 39 человек (13 мужчин и 26 женщин) с ГИСО различной локализации. Средний возраст больных составил 60 лет (56 лет у мужчин и 62 года для женщин). В 56,4% случаев опухоль локализовалась в желудке, в 20,5% случаев в тонкой кишке. Остальной материал был получен из опухолей других отделов ЖКТ. Диагноз ГИСО устанавливался на основе гистологических и иммуногистохимических исследований, проведенных в отделении патологической анатомии ГБУЗ МГОБ 62 ДЗМ.

Образцы опухолевой ДНК были проанализированы на наличие мутаций в генах *KIT* (экзоны 9,11,13 и 17) и *PDGFRa* (экзоны 12 и 18) с помощью ПЦР с высокоразрешающим плавлением и секвенирования по Сэнгеру. Двенадцать микросателлитных локусов на 3, 9, 13, 17 и 22 хромосомах, связанных с контролем клеточного цикла или поддержания клеточного микроокружения (D22S683, D22S446, D22S685, D22S689, D22S445, D13S262, D22S425, D9S162, D17S804, D17S796, D3S1286, D17S520) были проанализированы на потерю гетерозиготности в опухолевой ДНК методом фрагментного анализа. ПЦР с высокоразрешающим плавлением проводился на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA), секвенирование и фрагментный анализ на приборе ABI 3500 Series Genetic Analyzer (Life Technologies, USA).

Результаты: Генетический анализ удалось провести для всех 39 образцов (22 опухоли желудка (56,4%) и 8 – тонкой кишки (20,5%)). Мутации в гене *KIT* (32/39, 82,1%) и мутации в гене *PDGFRa* (2/39, 5,1%) были выявлены в 34 образцах опухолевой ДНК. 85,3% (29/34) из них локализовались в 11 экзоне гена *KIT*, из которых 68,9% (20/29) были представлены делециями, 27,6% (8/29) – точечными мутациями, в 1 случае (3,5%) была выявлена дупликация. Мутации в 9 экзоне гена *KIT* обнаруживались в 8,8% (3/34) образцов и являлись типичной дупликацией 2 аминокислот. Мутаций в 13 и 17 экзонах гена *KIT* обнаружено не было. Мутация в 12 экзоне гена *PDGFRa* была обнаружена только в 1 образце, так же как и мутация в 18 экзоне этого гена (2%).

Степень злокачественности ГИСО была оценена согласно критериям, предложенным С. Fletcher и М. Miettinen

(2002 г). Всего было выявлено 6 опухолей с низкой степенью, 9 со средней степенью и 24 с высокой степенью злокачественности. Опухолей с «очень» низкой степенью злокачественности выявлено не было.

Анализ LOH был проведен на 39 парах опухолевой и нормальной ткани. Для более детального анализа все образцы были разделены на две группы, в первую вошли образцы с малым количеством потерь локусов (0-2), а во вторую – с большим количеством потерь (более 2). LOH 0-2 локусов (низкой степени) обнаруживалась в 25,6% (10/39) опухолей, в то время как 74,4% ГИСО содержало LOH более чем 2 локусов (высокой степени).

Далее проводилась оценка корреляции степени LOH и степени злокачественности ГИСО. Потери на хромосомах 3q, 9p и 13q наблюдались не более чем по одному локусу для всех трёх степеней злокачественности ГИСО. Потери на 17q были более значительны (до 3), однако, достоверной корреляции количества потерь и степени злокачественности не обнаруживалось. Статистически достоверная тенденция к увеличению потерь с ростом степени злокачественности заболевания была выявлена только для локусов на 22q. Так в группе низкой степени злокачественности количество образцов с малым количеством потерь на 22q составило 83,3% (5/6) в сравнении с 41,2% в группе высокой степени злокачественности ($p = 0,0504$, $OR = 1,6195$, $DI95 = 0,9999 - 1,9768$).

При анализе частоты встречаемости более агрессивной мутации в 11 экзоне гена *KIT*, затрагивающий 557 кодон, было обнаружено, что наибольшее число таких замен 80% (8/10) встречались в опухолях с высокой степенью злокачественности. При этом 75% (6/8) из них имели LOH более 2 локусов на 22q, хотя малый размер группы не позволил достигнуть статистической достоверности.

Выводы: В подавляющем большинстве исследованных образцов ГИСО были обнаружены мутации генов *KIT* или *PDGFRa* и LOH большого количества локусов на анализируемых хромосомах. Частота аллельных потерь 22q достоверно коррелировала с высокой степенью злокачественности опухоли. Для более детальной оценки связи LOH и степени агрессивности ГИСО необходимо изучение онкогенов, ассоциированных с микросателлитам, которые делецируются при LOH.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК МИ-РНК – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КАССЕТНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ МЕЛАНОМЫ

Бутенко Е.В., Гребенец А.В., Мирзазаде С.Р., Покудина И.О.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Меланома кожи является одной из наиболее агрессивных форм солидных злокачественных новообразований, при распространенных стадиях продолжительность жизни не превышает 3-11 месяцев и почти в 100% развивается устойчивость к терапии. Заболеваемость меланомой неуклонно растет во всем мире. Хотя многие детали, ведущие к развитию злокачественной меланомы известны, комплексно процесс меланомогенеза изучен недостаточно. Микро РНК (ми-РНК) представляют собой класс небольшой некодирующей РНК длиной ~ 22п.н., которая регулирует экспрессию генов на посттрансляционном уровне. В настоящее время хорошо известно, что изменение экспрессии ми-РНК наблюдается при многих видах рака, включая меланому. Ми-

РНК являются перспективными биомаркерами при онкологических заболеваниях. В настоящее время активно проводятся исследования, посвященные поиску ми-РНК-маркеров канцерогенеза при раке груди, легких, кишечника и других, при этом для меланомы имеются только единичные результаты исследований, большинство из которых являются пилотными, и проводились на выборках малых объемов. В связи с этим целью нашего исследования явился биоинформационный поиск ми-РНК, регулирующих группы генов, участвующих в патогенезе при меланоме.

Поиск ми-РНК проводили по базе данных miRTarBase путем автоматического сбора данных при помощи скрипта (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>). Поиск прово-

дили по 160 генам человека, экспрессия которых изменялась при меланоме по данным литературы.

В результате выявлены 5 ми-РНК, регулирующих 10 и более генов, ассоциированных с развитием меланомы (см. табл. 1), 11 ми-РНК, регулирующих экспрессию пяти и более генов (hsa-let-7b-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-

215-5p, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-125b-5p), 13 ми-РНК, регулирующих экспрессию четырех генов. Для 160 генов, ассоциированных с развитием меланомы, всего обнаружено 158 ми-РНК, участвующих в их регуляции.

Таблица 1

Микро РНК – кассетные регуляторы активности генов, ассоциированных с развитием меланомы

Ми-РНК	Кол-во генов-мишеней	Гены-мишени	Функции генов-мишеней
hsa-miR-335-5p	26	MUC15, RORA, IVL, TRIM29, CALML5, KLK7, MMP14, EHF, KRT5, CST6, SPRED1, SOX5, SERPINB5, PPL, BIRC5, DUSP6, CTH, HEY1, MAGED4B, MAGED2, KLK11, GDF15, KIT, POU2F3, GJB6, SLC16A4.	Опухолевые антигены меланомы, рецепторы гормонов ядерной и клеточной поверхности, факторы дифференцировки и развития эпителиоцитов, предотвращения апоптоза, регуляции транскрипции, разрушения внеклеточного матрикса, рецепторы факторов роста, ингибиторы и активаторы MAP-киназного каскада, протоонкогены, ионные каналы.
hsa-miR-26b-5p	20	POU2F3, CBLC, CDK2, CDK6, CTH, SOX5, LY6D, SLC16A4, HOXB7, RASGRF1, SPRR1A, FGFR3, RGS20, RDGFRL, EPHA2, DSC1, MAGEA11, SERPINB5, TYMS, S100A7.	Регуляторы пролиферации и дифференцировки кератоцитов и эпителиоцитов, клеточного цикла, синтеза цистеина, ГТФ-азной активности, протоонкогены и опухолевые супрессоры, рецепторы факторов роста фибробластов, антигены лимфоцитов и опухолевые антигены меланомы.
hsa-miR-34a-5p	12	CDK6, CDK4, CDKN2A, MAGEA6, MAGEA3, MAGEA2, TP53, EPHA2, MAP2K1, SFN, TYMS, RRM2.	Регуляторы клеточного цикла и апоптоза, опухолевые антигены меланомы.
hsa-miR-124-3p	11	CDKN2A, CDK6, CDK2, CDK4, AKT3, FLG, KRT14, NRAS, TRIM29, MMP19, SLC22A3.	Регуляторы клеточного цикла, пролиферации, дифференцировки и апоптоза, дифференцировки кератоцитов, онкогены, регуляторы разрушения внеклеточного матрикса и транспорта катионов.
hsa-miR-193b-3p	10	CDC6, CDK6, CDK4, RRM2, TYMS, EPHA2, S100A14, KRAS, PTEN, PEG10.	Регуляторы клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки, протоонкогены и опухолевые супрессоры.

Таким образом, выявлены пять ми-РНК, являющихся мультигенными регуляторами при меланоме, и поэтому перспективных для экспериментальной проверки в качестве биомаркеров канцерогенеза при меланоме. Анализ функций генов-мишеней ми-РНК показал, что miR-335-5p контролирует экспрессию 26 генов, среди которых более поло-

вины составляют опухолевые антигены меланомы факторы дифференцировки и развития эпителиоцитов. Это позволяет предположить, что miR-335-5p является потенциально специфичным биомаркером новообразований кожи, а также перспективным для выявления мутаций, приводящих к злокачественной трансформации эпителиальных тканей.