

Молекулярно-генетические нарушения как критерии в дифференциальной диагностике редких опухолей почки

Molecular-genetic alterations as criteria in differential diagnostics of rare renal tumors

O.I. Apolikhin, D.S. Mikhaylenko, A.E. Mikhalychenko, D.V. Zaletayev, G.D. Efremov, A.V. Sivkov

Renal cancer is a heterogeneous group of tumors, the most common of which is the clear cell carcinoma, less common papillary and chromophobe carcinomas. Pathological examination faces difficulties in the differential diagnosis of malignant chromophobe carcinoma and benign oncocytomas, and between types I and II papillary renal carcinoma. However, the precise verification of these types of tumors is required for an adequate prognosis and treatment planning. We have provided search for STR-markers and a complex molecular genetic analysis of chromosome 1, 2, 6, 10, 13q, 21q and 17 in four chromophobe carcinomas and three oncocytomas, and analysis of the MET gene mutations in 13 papillary carcinomas to develop criteria for differential diagnosis of rare tumors of the kidney. It was demonstrated that allelic imbalance and/or microsatellite instability in two or more from the 12 selected loci are characteristic for chromophobe carcinomas and missing in oncocytomas ($p = 0.029$). Next, we have performed development of criteria for the differential diagnosis of chromophobe carcinomas and oncocytomas by the supervised classification analysis, based on a logistic regression model with regularization. Accuracy on the training set was more than 90%, which allows us to clearly determine the pattern of alterations in 10 STR-markers typical for chromophobe carcinoma. Somatic mutations in the MET gene, in contrast, cannot be considered as diagnostic markers of papillary carcinoma type I due to the low frequency. Thus, we have provided a method for differential diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma by molecular genetic analysis of the primary tumor.

The reported study was partially supported by RFBR, research project No. 12-04-31005 мол_а.

О.И. Аполихин¹, Д.С. Михайленко^{1,2}, А.Е. Михальченко², Д.В. Залетаев², Г.Д. Ефремов¹, А.В. Сивков¹

¹ ФГБУ «НИИ урологии» Минздрава России

² ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН

Ежегодно в мире регистрируют около 200 000 новых случаев рака почки (РП) и 100 000 смертей от этого заболевания, что позволяет считать его одной из основных проблем современной онкоурологии. Это гетерогенная группа опухолей, самой частой из которых является светлоклеточная карцинома (80%), реже встречаются папиллярная (15%) и хромофобная (5%) карциномы [1]. Большинство работ по поиску новых маркеров РП в качестве основного предмета исследования рассматривают светлоклеточную карциному, при этом наблюдается недостаток лабораторных тестов, которые могут использоваться в диагностике других гистологических форм РП. Гистологическое и иммуногистохимическое исследования в ряде случаев не позволяют провести дифференциальную диагностику между хромофобной карциномой и онкоцитомой. Хромофобная карцинома – злокачественная опухоль, склонная к метастазированию, а онкоцитомы – доброкачественная опухоль с благоприятным прогнозом [2, 3]. Генетические нарушения представляют собой наиболее ранние события в канцерогенезе, некоторые из них специфичны для определенных типов новообразований и представляют собой потенциальные маркеры РП [4]. Ряд

авторов провели сравнительное исследование хромофобного РП и онкоцитомы на наличие делеций и амплификаций участков генома с помощью сравнительной геномной гибридизации (Affymetrix GeneChip Mapping 250 K NspI), определения копийности участков генома по генотипированию большого количества однонуклеотидных полиморфизмов (Affymetrix GeneChip Mapping 100 K SNP) и генотипирования по 53 STR-маркерам, распределенным по всем хромосомам. Результаты этих работ во многом согласуются и показывают, что отклонения от диплоидного набора хромосом 2, 6, 10, 13q, 17 и, в меньшей мере, 1 и 21q в совокупности могут представлять собой критерий дифференциальной диагностики хромофобного РП и онкоцитомы [5-7]. Было бы целесообразно наряду с дорогостоящими микрочиповыми технологиями сформировать панель из STR-маркеров для дифференциальной диагностики этих опухолей с помощью ПЦР и фрагментного анализа на капиллярном секвенаторе, что позволило бы внедрить ее в работу большинства учреждений урологического и онкологического профилей. Другой аспект диагностики редких вариантов РП – определение I и II подтипов папиллярной карциномы почки. Трудность заключается в том, что среди опухолей почек, ■

не только указанный выше тип РП имеет папиллярное строение (папиллярный компонент в ряде случаев находят в медуллярной карциноме, карциноме собирательных протоков, почечно-клеточной-карциноме с транслокацией области Хр11.2, муцинозных тубулярной и веретенчатых карциномах). Кроме того, истинные папиллярные карциномы почек могут иметь смешанное строение, в котором соседствуют участки I и II типов, и содержать тубулярный, солидный или гломерулоподобный компонент. В таких случаях применяют трудоемкий и затратный иммуногистохимический анализ [8]. Тип II характеризуется неблагоприятным прогнозом по сравнению с типом I, что установлено в ходе мета-анализа ряда работ и рекомендуется Европейской ассоциацией урологов учитывать как прогностический критерий [9, 10]. Показано, что наследственная папиллярная карцинома 1-го типа (OMIM 605074) развивается вследствие герминальных активирующих мутаций в протоонкогене *MET* в эк-

зонах 15-21 [11]. Позднее у пациентов со спорадическим папиллярным РП в части случаев были выявлены соматические мутации *MET*, аналогичные герминальным мутациям при наследственном папиллярном РП I типа, однако их частота и специфичность для спорадических первичных опухолей I типа остаются дискуссионными вопросами [12].

Целью настоящей работы является комплексный молекулярно-генетический анализ аллельного дисбаланса хромосом 2, 6, 10, 13q, 17 и 21q, мутаций *MET* для выявления маркеров дифференциальной диагностики при хромофобной карциноме, онкоцитоме и папиллярной карциноме почки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал. В работе проанализированы 20 парных образцов редких первичных опухолей почки (опухольная и гистологически не измененная прилегающая ткани) в виде парафиновых блоков: 13 папил-

лярных карцином (6 – I типа, 5 – II типа и 2 – смешанные), 4 хромофобные карциномы и 3 онкоцитомы. Дополнительно исследовали 39 образцов светлоклеточной карциномы почки.

Получение геномной ДНК. Срезы с парафиновых блоков, содержащие не менее 70% опухолевых клеток, предварительно депарафинизировали с помощью ксилола и этанола, затем выделяли геномную ДНК с помощью набора AllPrep®DNA/RNA FFPE Kit («QIAGEN», Германия).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реакционной смеси следующего состава: 20-50 нг геномной ДНК, 1,5 мМ MgCl₂, 1,5 мМ каждого dNTP, по 2,5 пмоль праймеров, 1 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 5 мкл буфера для ПЦР 5x («Интерлабсервис», Москва), объем смеси составлял 25 мкл. Температурные параметры: начальная денатурация при 95 °С 1 мин 30 сек, далее 30 циклов при 95 °С 45 сек, 30 сек при T_m праймеров, 72 °С 30 сек, финальная элонгация 72 °С 2 мин (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры для ПЦР

Экзон <i>MET</i>	Последовательность, 5'→3'	T _m , °С	ПЦР-продукт, п.н.	Локус	Последовательность, 5'→3'	T _m , °С	ПЦР-продукт, п.н.
Поиск мутаций в гене <i>MET</i>				Определение аллельного дисбаланса (продолжение)			
15	gct ttc aaa att aat act tag tct ac	60	552	D2S1336	TAMRA-gac agg gtt gaa aac aca gc	64	241-261
	ctt gtt atc act gct ctg tca gtt g				aaa taa tga gca tgg gct tg		
16	ggc cga tgt tac tca cct ttt cag tg	60	507	D2S1782	FAM-ctg act tca ctg ctg tta ttg c	55	119-135
	cca caa ggg gaa agt gta aat caa c				aaa ggc aaa gaa agg gac tg		
17	caa gat gct aac tgt gtg gtt tac c	60	432	GAAT3A06	R6G-ccc atg aat gct gag act tt	55	177-189
	gag gtg cat ttg aat gat gct aac				ttg cag tcc ttt tca gta agg		
18	gac caa act aat ttt tga gac aag	60	367	D10S1216	ROX-tgg gta aca cag taa gat ccc	65	207-235
	cac atc gat tta aga ttg taa cag				gac tac tcc tga cac gag agg		
19	ctt cct tca gaa gtt atg gat ttc	57	404	D10S2469	FAM-tta att cta cat cta ggt tta ggg g	55	186-218
	gaa gaa aac tgg aat tgg tgg tgt tg				ata ggc aga tac aca gaa tat gtc c		
20	cag aaa ccg tat tga gta tgt aaa gc	59	369	D13S634	FAM-tca ata gga taa ata gac aga	58	367-385
	gca ttt tag cat tac ttc ata tct g				tag gat tca cac cag taa ccc		
21	gaa gac tcc tac aac ccg aat act g	59	489	D13S742	R6G-ccc acc tcc aga gtt ccc aat	58	340-364
	caa gtc cta taa tag tgc aat ttt g				tag gaa tgg aaa tag gtt gta		
Определение аллельного дисбаланса				D17S1298	R6G-ttc aca ctt tta gtg ttg gtg g	55	246-254
Локус	Последовательность, 5'→3'	T _m , °С	ПЦР-продукт, п.н.		tga cct gag ttt gac tgg gt		
D1S2142	FAM-tgg tag cag gat atg att gtg aag c	60	104-132	D21S11	FAM-ttt ctc agt ctc cat aaa tat gtg	58	172-260
	agc cca gaa caa tct gtg ac				gat gtt gta tta gtc aat gtt ctc		
D1S3465	ROX-aga tag ata gga agg cag gc	60	119-135	D21S1411	ROX-ctc cca gcc ttc taa ata ttc	58	221-245
	acc tgt gag aaa taa cag ttt gc				gga taa ata gaa cat agg tag		

Оборудование и расходные материалы
для гемодиализа

AsahiKASEI
NIKKISO



Nikkiso DBB05 – высокотехнологичный аппарат, выполняющий все виды гемодиализа с возможностью кардиопротективного диализа с помощью безацитатной биофильтрации.

Оборудование и расходные материалы
для терапевтического плазмафереза

Plasauto Σ
AsahiKASEI



Plasauto – для острого гемодиализа и терапевтической плазматерапии с возможностью функции поддержки печени, удаления вируса гепатита С и больших молекул таких как: холестерин; липопротеиды низкой плотности; циркулирующие иммунные комплексы; антитела и тд. Широко применяется при кризах отторжения трансплантата в отделениях трансплантации органов.



МЕДИЦИНСКАЯ
КОМПАНИЯ

121108, Россия, Москва, ул. Ивана Франко, д. 4, корп. 15, оф. 9
Тел.: +7 (495) 380-00-80; Факс: +7 (495) 780-31-11
www.medicalcompany.ru

Оригинальная игла SPROTTE®
Отдельный класс спинальных игл

PAJUNK®

EpiSpin Lock – наборы
для комбинированной
спино-эпидуральной анестезии



Фрагментный анализ. Аллели STR-маркеров определяли методом фрагментного анализа 0,5-4 мкл ПЦР-продуктов с использованием стандарта молекулярной массы LIZ500 и полимера POP4 на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 («Applied Biosystems», США) согласно руководствам фирмы-производителя.

Секвенирование ПЦР-продукта. ПЦР-продукт объемом 7 мкл обрабатывали смесью 5 ед. экзонуклеазы I из *E.coli* и 1 ед. щелочной фосфатазы, затем проводили секвенирование с помощью набора ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 и генетического анализатора ABI PRISM 3100 по протоколам фирмы «Applied Biosystems». Идентификацию мутаций и полиморфизмов проводили с помощью интерактивной базы данных HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Статистическая обработка результатов. Для формирования критерия дифференциальной диагностики хромобной карциномы и онкоцитомы использовали классификационный анализ с обучением, основанный на модели логистической регрессии с регуляризацией. Точный двусторонний критерий Фишера (программа GraphPad InStat v. 3.05.) использовали при сравнении частот аллельного дисбаланса и микросателлитной нестабильности в различных типах опухолей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ доступной литературы показал, что критерии для дифференциальной диагностики хромобной карциномы и онкоцитомы с помощью

микросателлитов целесообразно формировать на основе исследования хромосом 1q, 2, 6p, 10, 13q, 17p и 21q, показывающих наиболее выраженные различия по количеству копий между хромобной карциномой и онкоцитомой [5-7]. Каждая из этих областей была проанализирована по 1-2 STR-маркерам. Основными критериями отбора, помимо локализации, были структура простого тандемного повтора (совершенный повтор с единицей 3-5 нуклеотидов) и наличие информации в базах данных о его полиморфизме.

Поиск подходящих локусов проводили с помощью интерактивной программы UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu/>), в результате которого сформировали панель из 12 тетра-нуклеотидных STR-маркеров. Генотипирование проводили с помощью ПЦР, в которой один из праймеров в каждой паре был конъюгирован с флуоресцентным красителем, и последующего фрагментного анализа меченых ПЦР-продуктов на капиллярном генетическом анализаторе ABI3100 «Applied Biosystems» (США). Значение аллельного дисбаланса, где площади пиков опухолевого образца были нормализованы по сигналам этих же аллелей от нормальной ткани для корректировки эффекта преимущественной амплификации более короткого аллеля, вычисляли по формуле:

$$AI = \frac{\frac{S_{1T}}{S_{1N}}}{\frac{S_{1T}}{S_{1N}} + \frac{S_{2T}}{S_{2N}}}$$

где:

AI – показатель аллельного дисбаланса, S_{1T} и S_{2T} – площади пиков от первого и второго аллелей в опухолевом образце, S_{1N} и S_{2N} – площади пиков от первого и второго аллелей в образце нормальной ткани (рис 1). Значение AI при этом могло изменяться в интервале [0;1], если AI находился в границах $[0;0,3) \cup (0,7;1]$, то считали, что в образце опухолевой ткани присутствует аллельный дисбаланс. Хотя фирма «Applied Biosystems» предлагает проводить вычисления потери гетерозиготности (частный случай аллельного дисбаланса) по высотам пиков [13], ряд работ основаны на вычислении отношений площадей пиков как показателей, характеризующих количество ПЦР-продуктов, а не их концентрацию в зоне локального максимума при капиллярном электрофорезе [14, 15]. Эти подходом руководствуются и мы, анализируя площади пиков, соответствующих аллелям исследуемых STR-маркеров. Результаты генотипирования парных образцов (опухоль и прилегающая нормальная ткань от каждого из 4 пациентов с хромобной карциномой и 3 пациентов с онкоцитомой) представлены в таблице 2. При генотипировании в образцах также выявляли микросателлитную нестабильность – aberrантные аллели STR-маркера в опухолевой ткани, которые отсутствуют в нормальной ткани и возникают вследствие ошибок репликации простых тандемных повторов при инактивированной системе репарации неспаренных оснований [16].

Показано, что аллельный дисбаланс и/или микросателлитная нестабильность по двум и более локусам из 10 встречаются во всех хромобных карциномах, тогда как в онкоцитомах отсутствуют нарушения в тестируемых STR-маркерах (точный двусторонний критерий Фишера, $p=0.029$ при $\alpha=0.05$). Далее аллельный дисбаланс интерпретировали как количественную переменную, преобразованную с помощью функции $Y = |AI - 0,5|$ в значение от 0 до 0,5. Образцам, в которых была выявлена только микросателлитная нестабильность, придавалось значение 0,5 для того, чтобы это нарушение можно было учитывать на-

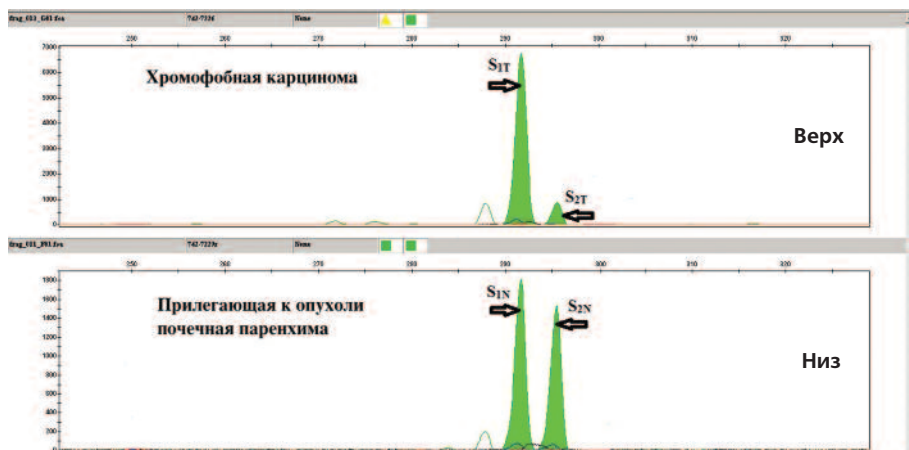


Рис. 1. Аллельный дисбаланс по локусу D13S1742 в хромобной карциноме

ряду с аллельным дисбалансом. Неинформативным случаям (гомозиготам) приписывали пограничное значение 0,2. Нарушения в хромосомах, анализируемых по двум STR-маркерам, коррелируют друг с другом (кроме неинформативных локусов). Поэтому для уменьшения эффекта переобучения из каждой анализируемой хромосомы был выбран локус с большим числом нарушений в образцах хромофобной карциномы, и была сформирована панель из 7 STR-маркеров: D1S2142, D2S1782, GAAT3A06, D10S2469, D13S634, D17S1298 и D21S11. Далее применяли метод классификационного анализа с обучением, основанный на модели логистической регрессии с регуляризацией. Решающее правило имеет следующий вид:

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-\theta^T X}}$$

где:

$Y = 1$ для хромофобной карциномы и $Y = 0$ для онкоцитомы, X – вектор значений от 0 до 0,5, в которые был преобразован AI, θ – вектор с оптимизированными параметрами при X . Для оптимизации параметров использовался алгоритм градиентного спуска с функцией:

$$J(\theta) = -\frac{1}{m} \left[\sum_{i=1}^m y^{(i)} \log h_{\theta}(x^{(i)}) + (1 - y^{(i)}) \log(1 - h_{\theta}(x^{(i)})) \right]$$

где

m – число пациентов в обучающей выборке; $y^{(i)}$ – тип опухоли для пациента i (1 в случае хромофобной карциномы и 0 – онкоцитомы); $h_{\theta}(x^{(i)})$ – предсказанное значение типа опухоли (от 0 до 1) для пациента i по его переменным x . Точность при сформированной обучающей выборке составила 92%. В результате был сформирован алгоритм, который использует в качестве входных данных матрицу значений аллельного дисбаланса и микросателлитной нестабильности для панели STR-маркеров, затем осуществляет подгонку введенных данных к логистической кривой и на выходе дает ряд значений вектора θ , однозначно задающих логистическую функцию для вероятностной дифференциальной диагностики хромофобной карциномы и онкоцитомы. Однако 7 STR-маркеров представляют собой необходимый и достаточный набор локусов для обучающей выборки, тогда как целесообразно в дальнейшем апробировать этот алгоритм на тестовой выборке большего объема, при этом включая в анализ все локусы, показавшие аллельный дисба-

ланс и/или микросателлитную нестабильность при высокой гетерозиготности, т.е. 10 STR-маркеров из 12 первоначально выбранных для настоящего исследования (табл. 2). В нашей работе доброкачественные опухоли – онкоцитомы – не показали наличие aberrаций по тестируемым локусам, как и образцы нормальной почечной паренхимы. Это отчасти не согласуется с данными высокоразрешающих методов анализа хромосомных aberrаций на микрочипах, хотя подтверждается методами молекулярной цитогенетики (FISH на интерфазных и метафазных хромосомах) [7, 17]. Вместе с тем, имеются данные о том, что некоторые онкоцитомы имеют потерю гетерозиготности или амплификацию по хромосомам 1, X и Y, а также транслокации с вовлечением хромосом 6, 9 и 11 [18]. Возможно, целенаправленное тестирование этих нарушений позволит сформировать паттерн aberrаций, который позволит дифференцировать онкоцитому не только от хромофобной карциномы, но и от других типов опухолей почки.

В настоящей работе проведены ПЦР и последующее секвенирование экзонов 15-21 гена MET, кодирующих тирозинкиназный домен рецептора HGF, с целью определения мутаций, которые характерны для папиллярной карциномы почки I типа. В одном образце опухоли смешанного строения (I/II типов) выявлена соматическая мутация с.3743A→G, приводящая к замене аминокислоты p.Y1248C и охарактеризованная в базе данных HGMD как активирующая миссенс-мутация при наследственной папиллярной карциноме I типа (rs121913246). Другие обнаруженные однонуклеотидные замены представляли собой известные синонимичные SNP в 20 и 21 экзонах: с.3912C→T (rs41736), с.4026C→T (rs201519623), с.4071G→A (rs2023748) и с.4146G→A (rs41737). Таким образом, мутации MET редко встречаются в спорадических папиллярных карциномах и не могут быть использованы в качестве маркера дифференциальной диагностики, даже если со временем будут накоплены данные, подтверждающие их

Таблица 2. Аллельный дисбаланс и микросателлитная нестабильность в хромофобной карциноме и онкоцитоме почки

STR-маркер	Хромофобные карциномы				Онкоцитомы		
	5006	13579	7226	10763	5858	14912	22058
D1S3465	MSI	NI	AI	N	NI	NI	N
D1S2142	MSI	N	AI	MSI	N	N	N
D2S1782	N	NI	AI	N	NI	N	N
D2S1336	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
GAAT3A06	MSI	N	NI	N	N	N	N
D10S2469	AI, MSI	N	AI	N	N	N	N
D10S1216	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
D13S634	MSI	AI, MSI	AI	N	N	N	N
D13S742	AI	N	AI	N	N	N	NI
D17S1298	MSI	N	AI	N	NI	NI	N
D21S11	AI, MSI	MSI	AI	AI	N	N	N
D21S1411	AI, MSI	N	AI	N	N	N	N

Примечание: сверху указаны номера блоков с материалом опухолей, курсивом выделены неинформативные STR-маркеры, полужирным шрифтом – минимальный набор локусов для алгоритма дифференциальной диагностики; NI (non-informative) – неинформативные случаи, AI (allelic imbalance) – аллельный дисбаланс, MSI (microsatellite instability) – микросателлитная нестабильность.

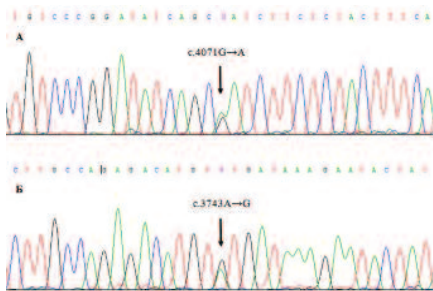


Рис. 2. Секвенирование однонуклеотидных замен *MET* в папиллярной карциноме
Обозначения: стрелками указаны позиции однонуклеотидных замен, А – полиморфизм с.4071G→А, Б – миссенс-мутация с.3743А→G (р.Y1248С).

специфичность для папиллярного РП I типа. Приблизительная оценка частоты мутаций на уровне 8% (1/13) в нашей работе близка к данным других авторов, обнаружившим мутации *MET* в 12% папиллярных карцином почки [12]. Ранее показано, что определенный тип опухоли, развивающейся при моногенном наследственном онкологическом синдроме и имеющей герминальные мутации в соответствующем гене-кандидате, часто не имеет или характеризуется низкой частотой аналогичных соматических мутаций в идентичных спорадических новообразованиях. В нарушении экспрессии *MET* и/или связанного с ним сигнального пути могут играть роль другие механизмы (регуляция на уровне транскрипции или трансляции, эпигенетические факторы, отношение скоростей синтеза и деградации белка и т.п.). Несмотря на

низкую частоту соматических мутаций, гиперэкспрессию *MET* наблюдают в 90% папиллярных карцином почки [19]. Похожая ситуация встречается и в регуляции экспрессии других онкогенов, например, активация *HRAS* в результате соматических мутаций показана в 10% случаев рака мочевого пузыря, однако гиперэкспрессия белка *HRAS* происходит значительно чаще, что свидетельствует о наличии других механизмов активации гена [2]. Относительно редко наблюдают иную картину, как, например, в случае светлоклеточной карциномы почки: герминальные точечные мутации *VHL* являются причиной синдрома Хиппеля-Линдау (наследственный светлоклеточный РП), соматические точечные мутации *VHL* встречаются в 50-70% спорадических светлоклеточных карцином почки и специфичны для этого типа РП [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Патоморфологическое исследование зачастую сталкивается с трудностями в определении хромофобной карциномы и онкоцитомы почки, так как эти опухоли имеют общее происхождение и сходство на гистологическом уровне. Однако хромофобная карцинома – злокачественная, а онкоцитома – доброкачественная опухоль, что обуславливает различный прогноз заболевания. Нами проведен поиск STR-маркеров и комплексный

молекулярно-генетический анализ аллельного дисбаланса участков хромосом 1, 2, 6, 10, 13q, 17 и 21q в 4 хромофобных карциномах и 3 онкоцитомах. Показано, что аллельный дисбаланс и/или микросателлитная нестабильность по 2 и более из 12 выбранных локусов встречаются во всех хромофобных карциномах, тогда как в онкоцитомах отсутствуют нарушения в тестируемых STR-маркерах ($p = 0.029$ при $\alpha = 0.05$). Разработку критерия дифференциальной диагностики хромофобной карциномы и онкоцитомы осуществляли методом классификационного анализа с обучением, основанном на модели логистической регрессии с регуляризацией. Точность критерия при сформированной обучающей выборке составила более 90%, что позволяет достоверно выявлять паттерн нарушений, характерный для хромофобной карциномы. Соматические мутации гена *MET*, напротив, не могут служить диагностическим маркером папиллярного рака почки I типа вследствие низкой частоты встречаемости. Таким образом, предложена система из 10 STR-маркеров для дифференциальной диагностики хромофобной карциномы и онкоцитомы почки с помощью молекулярно-генетического анализа образцов первичной опухоли.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-31005 мол_а. ■

Резюме:

Рак почки – гетерогенная группа опухолей, самой частой из которых является светлоклеточная карцинома, реже встречаются папиллярная и хромофобная карциномы. Патоморфологическое исследование сталкивается с трудностями в дифференциальной диагностике злокачественной хромофобной карциномы и доброкачественной онкоцитомы, а также между I и II типами папиллярной карциномы почки. Вместе с тем, точная верификация указанных типов опухолей необходима для адекватного прогноза заболевания и планирования лечения. В работе проведен поиск STR-маркеров и комплексный молекулярно-генетический анализ участков хромосом 1, 2, 6, 10, 13q, 17 и 21q в 4 хромофобных карциномах и 3 онкоцитомах, а также анализ мутаций гена *MET* в 13 папиллярных карциномах для разработки критериев дифференциальной диагностики редких опухолей почки. Показано, что аллельный дисбаланс и/или микросателлитная нестабильность по 2 и более из 12 выбранных локусов встречаются во всех хромофобных карциномах и отсутствуют в онкоцитомах ($p = 0.029$). Разработку критерия дифференциальной диагностики хромофобной карциномы и онкоцитомы осуществляли методом классификационного анализа, основанном на модели логистической регрессии с регуляризацией. Точность критерия на обучающей выборке составила более 90%, что позволяет достоверно выявлять паттерн нарушений 10 STR-маркеров, характерный для хромофобной карциномы. Соматические мутации гена *MET*, напротив, не могут служить диагностическим маркером папиллярного рака почки I типа вследствие низкой частоты встречаемости. Таким образом, предложен метод дифференциальной диагностики хромофобной карциномы и онкоцитомы почки с помощью молекулярно-генетического анализа первичной опухоли.

Ключевые слова: рак почки, хромофобная и папиллярная карциномы, онкоцитомы, аллельный дисбаланс, микросателлитная нестабильность, ген MET, точечные мутации.

Key words: renal cancer, chromophobe and papillary renal cell carcinomas, oncocytoma, allelic imbalance, microsatellite instability, gene MET, point mutations.

ЛИТЕРАТУРА

- Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms // *Hum Pathol.* 2009. Vol. 40, N 1. P. 10-29.
- Yusenko MV. Molecular pathology of renal oncocytoma: a review // *Int J Urol.* 2010. Vol. 17. P. 602-614.
- Yusenko MV. Molecular pathology of chromophobe renal cell carcinoma: a review // *Int J Urol.* 2010. Vol. 17. P. 592-601.
- Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. [Под ред. Пальцева М.А., Залетаева Д.В.]. М.: Медицина. 2009. 384 с.
- Nagy A, Buzogany I, Kovacs G. Microsatellite allelotyping differentiates chromophobe renal cell carcinomas from renal oncocytomas and identifies new genetic changes // *Histopathol.* 2004. Vol. 44. P. 542-546.
- Tan MH, Wong CF, Tan HL, Yang XJ, Ditlev J, Matsuda D, Khoo SK, Sugimura J, Fujioka T, Furge KA, Kort E, Giraud S, Ferlicot S, Vielh P, Amsellem-Ouazana D, Debre B, Flam T, Thiounn N, Zerbib M, Benoit G, Droupy S, Molinie V, Vieillefond A, Tan PH, Richard S, Teh BT. Genomic expression and single-nucleotide polymorphism profiling discriminates chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma // *BMC Cancer.* 2010. Vol. 10. P. 196.
- Yusenko MV, Kuiper RP, Boethe T, Ljungberg B, van Kessel AG, Kovacs G. High-resolution DNA copy number and gene expression analyses distinguish chromophobe renal cell carcinomas and oncocytomas // *BMC Cancer.* 2009. Vol. 9. P. 152.
- Tickoo SK, Reuter VE. Differential diagnosis of renal tumors with papillary architecture // *Adv Anat Pathol.* 2011. Vol. 18. P. 120-132.
- Lee JH, Choi JW, Kim YS. The value of histologic subtyping on outcomes of clear cell and papillary renal cell carcinomas: a meta-analysis // *Urol.* 2010. Vol. 76. P. 889-894.
- Клинические рекомендации Европейской ассоциации урологов. Онкоурологические заболевания. [пер. Российского общества онкоурологов]. М.: «АБВ-пресс», 2009.
- Schmidt LS., Nickerson ML, Angeloni D, Glenn GM, Walther MM, Albert PS, Warren MB, Choyke PL, Torres-Cabala CA, Merino MJ, Brunet J, Berez V, Borrás J, Sesia G, Middleton L, Phillips JL, Stolle C, Zbar B, Pautler SE, Linehan WM. Early onset hereditary papillary renal carcinoma: germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene // *J Urol.* 2004. Vol. 172. P. 1265-1261.
- Salvi A, Marchina E, Benetti A, Grigolato P, De Petro G, Barlati S. Germline and somatic c-met mutations in multifocal/bilateral and sporadic papillary renal carcinomas of selected patients // *Int J Oncol.* 2008. Vol. 33. P. 271-276.
- Relative fluorescent quantitation on capillary electrophoresis systems: screening for loss of heterozygosity in tumor samples on the Applied Biosystems 3130 series genetic analyzers with GeneMapper® Software v3.7. Applied Biosystems. © – 2004.
- Pinheiro RF, Serio FM, Silva MR, Briones MR, Chauffaille ML. Association of loss of heterozygosity with cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome // *Braz J Med Biol Res.* 2008. Vol. 41. P. 610-614.
- Zaky AH, Watari J, Tanabe H, Sato R, Moriiche K, Tanaka A, Maemoto A, Fujiya M, Ashida T, Kohgo Y. Clinicopathological implications of genetic instability in intestinal-type gastric cancer and intestinal metaplasia as a precancerous lesion // *Am J Clin Pathol.* 2008. Vol. 129. P. 613-621.
- Altavilla G, Fassan M, Busatto G, Orsolan M, Giacomelli L. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression in renal tumors // *Oncol Rep.* 2010. Vol. 24. P. 927-932.
- Brunelli M, Delahunt B, Gobbo S, Tardanico R, Eccher A, Bersani S, Cossu-Rocca P, Parolini C, Balzarini P, Menestrina F, Cheng L, Eble JN, Martignoni G. Diagnostic usefulness of fluorescent cytogenetics in differentiating chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma // *Am J Clin Pathol.* 2010. Vol. 133. P. 116-126.
- Hudako R, May M, Aviv H. A new translocation between chromosomes 6 and 9 helps to establish diagnosis of renal oncocytoma // *Ann Diagn Pathol.* 2011. Vol. 15. P. 278-281.
- Choi JS, Kim MK, Seo JW, Choi YL, Kim DH, Chun YK, Ko YH. MET expression in sporadic renal cell carcinomas // *J Korean Med Sci.* 2006. Vol. 21. P. 672-677.
- Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, Zaridze D, Matveev V, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Navratilova M, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Mukeria A, Holcatova I, Schmidt LS, Toro JR, Karami S, Hung R, Gerard GF, Linehan WM, Merino M, Zbar B, Boffetta P, Brennan P, Rothman N, Chow WH, Waldman FM, Moore LE. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14. P. 4726-4734.