

Цитогенетические исследования при двустороннем раке почек

В.Б. Матвеев¹, Т.В. Марилов¹, К. Юнкер²

¹Отделение урологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, ²Урологическая клиника Йенского университета, Германия

CYTOGENETIC STUDIES OF BILATERAL RENAL CELL CARCINOMA

V.B. Matveyev, T.V. Marilov, K. Junker

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Jena University Urology Clinic, Germany

Aim. To study chromosomal abnormalities in bilateral renal cell carcinoma (RCC).

Materials and methods. Paraffin-embedded specimens from 8 patients with bilateral RCC were examined by comparative genomic hybridization.

Results. 1 to 6 chromosomal aberrations were found in each sample. The same chromosomal aberrations in both tumors in 7 (87.5%) cases chromosomal changes were different in one (12.5%) case.

Conclusion. Further genetic studies of bilateral RCC may give a better insight into the biology, diagnosis, and treatment of bilateral RCC.

Введение

На сегодняшний день очевидно, что субстратом инициации, развития и прогрессирования опухолевого процесса являются разнообразные генетические нарушения. Идентификация генов, вовлеченных в опухолевый процесс, качественная и количественная оценка генетических нарушений и их клинического значения представляют огромный интерес с точки зрения как фундаментальной, так и прикладной онкологии [1–4]. В этой связи билатеральный рак почек является интереснейшим объектом генетических исследований. Появление и широкое внедрение разнообразных молекулярных технологий, таких, как сравнительная геномная гибридизация (СГГ), флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), микросателлитные исследования и пр., позволяют значительно расширить границы наших познаний в области данной патологии [6–11].

Материалы и методы

Впервые в отечественной онкоурологии применялась методика СГГ – молекулярная цитогенетическая технология, позволяющая с использованием ДНК, меченной флюорохромами, показать амплификацию и делецию в клетках с различными хромосомными нарушениями. Применение методики СГГ для анализа солидных опухолей впервые было предложено А. Kallioniemi и соавт. [5] в 1992 г. Метод позволяет провести полный анализ структурных хромосомных аномалий всего генома в пределах одного эксперимента. Он основан на сравнении тестируемой и контрольной ДНК, меченной разными флюорохромами, которые смешивают в соотношении 1:1 и гибридизируют на метафазных кариотипически здоровых хромосомах. Хромосомный дисбаланс в исследуемом образце оценивают по разнице в интенсивности флюоресценции двух разных флюорохромов с помощью вычисления коэффициента флюоресценции (КФ). Изменение КФ вдоль длины хромосомы отражает изменение относительного со-

держания числа копий ДНК (делеция, амплификация) в исследуемом участке хромосомы по сравнению с контролем.

Материалом для проведения СГГ являлись парафиновые блоки, содержащие удаленную опухолевую ткань 8 пациентов с синхронным ненаследственным билатеральным раком почек, оперированных в отделении урологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2000–2002 гг. Гистологически во всех случаях был верифицирован светлоклеточный почечноклеточный рак различных степеней клеточной анаплазии. Первичный отбор блоков произведен в отделении патоморфологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Исследование было проведено совместно с медико-генетической лабораторией отделения урологии Йенского университета Фридриха Шиллера (зав. клиникой проф. Г. Шуберт, зав. лабораторией докт. биол. наук К. Юнкер).

Этапы исследования представлены на рис. 1.

Первым этапом была выполнена селекция и изоляция опухолевой и нормальной ДНК с использованием коммерческого набора (Qiagen, Eurogentec, Serang, Бельгия) с добавлением 30–50 мкл раствора протеиназы К. Обработанный таким образом материал помещали в инкубатор минимум на 2 ч при температуре 50°C. Далее в полученном растворе оценивали концентрацию ДНК, она должна быть не менее 100 нг/мкл.

Вторым этапом (2а) проводили амплификацию исследуемой ДНК (как опухолевой, так и нормальной) по стандартному протоколу DOP-полимеразной цепной реакции (DOP-PCR) с включением секвеназы (sequenase) на первых 8 циклах и ТАQ-полимеразы (Stoffel fragment) на последующих 30 циклах. Таким образом достигалось количество ДНК, достаточное для последующих процедур. Следует отметить одно из несомненных достоинств методики – возможность проведения эксперимента даже при весьма незначительном исходном количестве исследуемой ДНК.

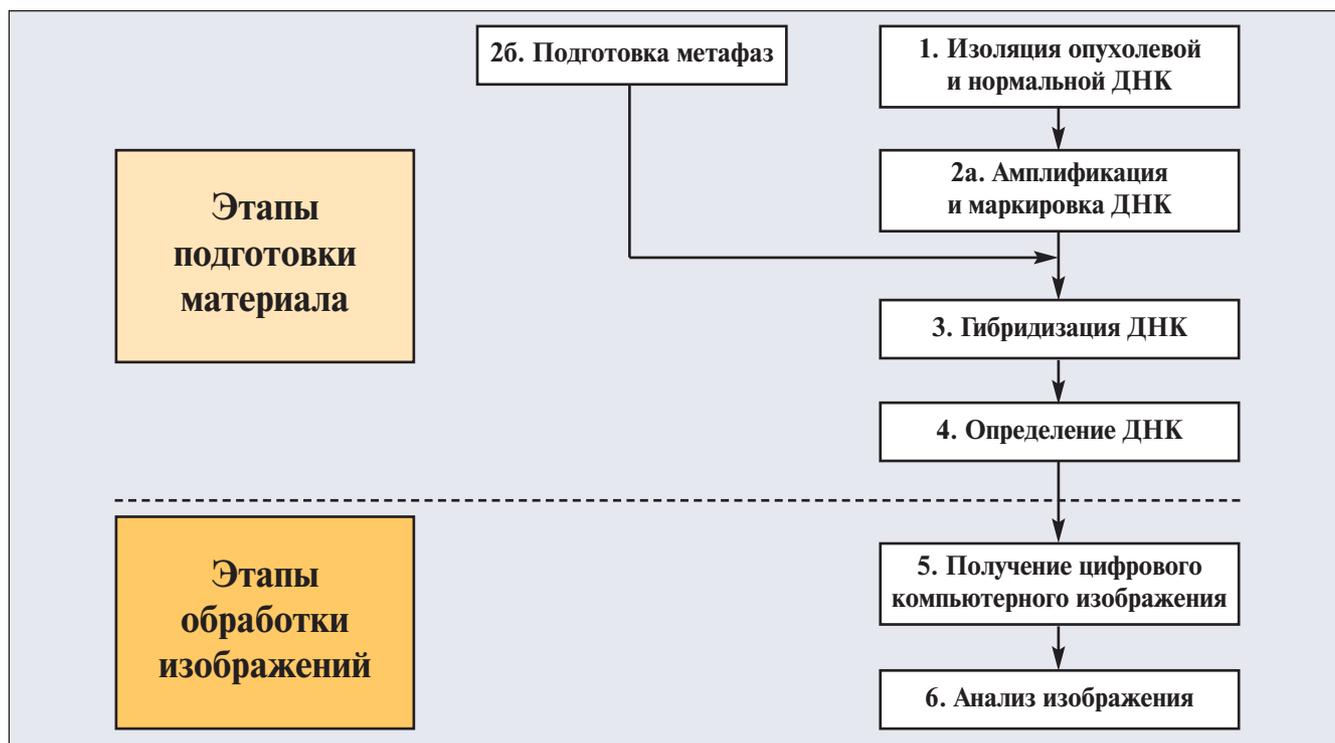


Рис. 1. Этапы исследования

Отфильтрованный и центрифугированный раствор маркировали, используя следующие нуклеотиды гаптены – Biotin-16-dUTP для опухолевой ДНК и Digoxigenin-11-dUTP для нормальной ДНК. В настоящее время стали доступны нуклеотидные аналоги, напрямую конъюгирующие с флюорохромами, – FITC-dUTP и TRITC-dUTP.

Параллельно (этап 26) производили подбор и подготовку метафазных кариотипически здоровых хромосом. Критерием отбора служит достаточное количество (не менее 15) качественных метафазных хромосом.

Третьим этапом была гибридизация опухолевой и нормальной ДНК (по 1 мкл) с 50 мкл Cot1-фракцией ДНК человека (для снижения риска кросс-гибридизации часто повторяющихся последовательностей ДНК в геномах) на отобранных нормальных метафазных хромосомах в течение 2–4 сут при температуре 37°C.

Четвертым этапом является определение ДНК. С этой целью гибридизованные ДНК обрабатывали раствором флюоресцента Avidin-FITC (1 мг/мл) и флюорохрома Anti-Digoxigenin-Rhodamine (200 мг/мл) в соотношении 10 мкл anti-Dig-Rhodamin + 5 мкл Fluorescein-Avidin в 1000 мкл 3% BSA/4xSSC/0,1%Tween. Для контрокрашивания хромосом применяли 0,2 мг/мл раствор 4,6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорида (DAPI), разведенный дистиллированной водой в соотношении 1:5000.



Рис. 2. Метафазное монохромное цифровое изображение

Цифровые изображения (5-й этап) получали на базе компьютерной системы «Metasystems» (Германия), оборудованной цифровой камерой, при помощи микроскопа Axioplan (Zeiss, Германия) с применением объектива NEOFLUAR x63, N.A. 1.25 (Zeiss, Oberkochen, Германия), оборудованного набором фильтров для DAPI (Zeiss 02), FITC (Zeiss 10) и TRITC (хромофильтер HQ Cy3+). В каждом исследовании оценивали не менее 15 метафаз.

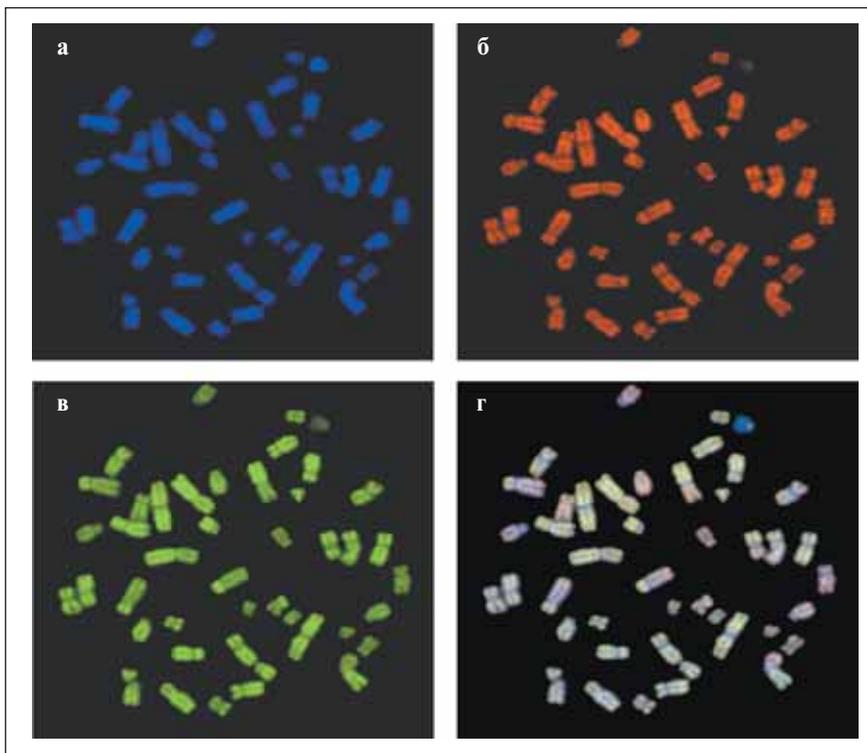


Рис. 3. Метафазные флюоресцентные цифровые изображения. Здесь и на рис. 4 и 5: а – DAPI, б – FITC, в – TRITC, г – DAPI + FITC + TRITC

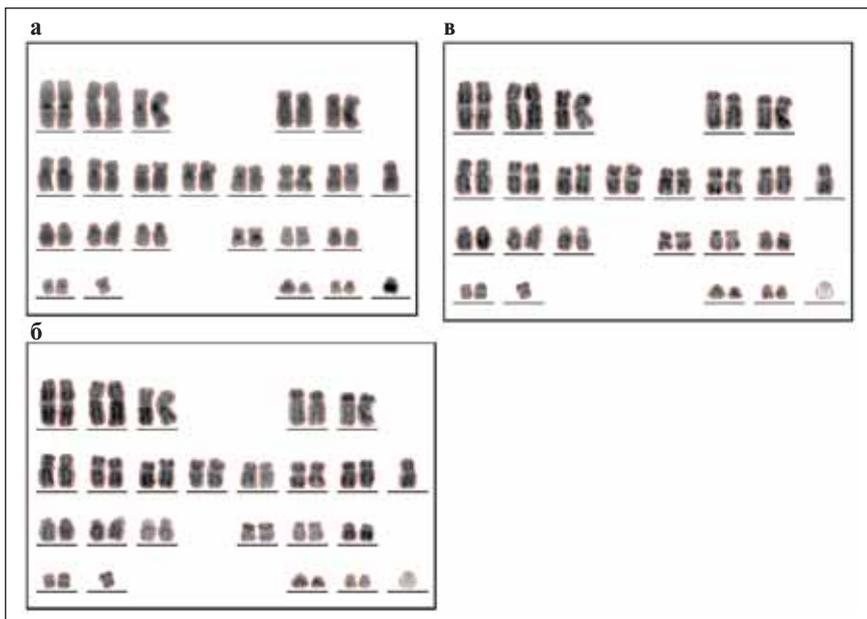


Рис. 4. Монохромные изображения кариограмм

Анализ (6-й этап) полученных изображений (рис. 2–5) с автоматическим построением кариограммы и вывод в ней стандартных идиограмм хромосом соответствующих идиограмм позволял создать суммарную модель хромосомных нарушений для каждого случая (рис. 6).

Используя полученные модели, можно, рассчитав КФ, отражающий отношение интенсивности зеленого свечения (исследуемая ДНК) к красному (контрольная ДНК), получить цветокодированное изображение по рассчитанному коэффициенту.

Нормальное содержание ДНК: отношение FITC/TRITC от 0,75 до 1,25 (синие участки хромосом).

Амплификация: отношение FITC/TRITC более 1,25 (зеленые участки хромосом).

Делеция: отношение FITC/TRITC менее 0,75 (красные участки хромосом).

Результаты

В данной работе исследовано 16 экземпляров ДНК, получено 240 метафазных профилей. По окончании компьютерной обработки были получены следующие данные (см. таблицу).

Количество выявленных хромосомных aberrаций – от 1 до 6 (в среднем от 2,5 до 4,5 aberrации в опухолевой ткани с каждой стороны). В 7 (87,5%) случаях из 8 имели место сходные мутации с обеих сторон, что позволяет предполагать единую природу опухолей обеих почек.

Обсуждение

Рак почек в целом и двусторонний рак, в частности, является весьма значимым объектом цитогенетических и молекулярно-генетических исследований последних лет.

Изучение характерных генетических изменений, свойственных различным типам рака почек, помогает глубже оценить природу этого заболевания, что позволит в будущем устанавливать генетический диагноз заболевания, создать методики ранней диагностики

и скрининга локализованного и двустороннего рака почек; разработать схемы и препараты молекулярно-генетической, иммунологической терапии данной патологии.

На данный момент генетические исследования выявили корреляцию между определенными хромо-

сомными нарушениями и бластоматозными изменениями в клетке, доказали, что специфические хромосомные aberrации характеризуют определенные этапы канцерогенеза рака почки. Молекулярно-генетические исследования двустороннего рака почек и патоморфологические и клинические исследования дополняют друг друга, открывая наиболее многообещающие перспективы решения данной проблемы. Молекулярно-генетический анализ групп пациентов с асинхронным (1-я группа) и синхронным (2-я) раком почки, проведенный Н. Кито и соавт. [6], выявил наличие единых совпадающих хромосомных мутаций в образцах опухолей у больных 1-й группы и несовпадающих – 2-й. Результаты данного исследования подтверждают теорию единой клональности асинхронного рака почки.

В нашем исследовании в 1 (12,5%) случае диагностированы хромосомные aberrации различной локализации, что говорит в пользу различной клональности опухолей.

При анализе клинических данных исследуемой группы больных следует отметить, что именно у пациента с различными хромосомными aberrациями имело место бурное прогрессирование процесса в виде множественного метастатического поражения легких и костей скелета, несмотря на радикально проведенное билатеральное хирургическое лечение. Пациент умер спустя 14 мес после начала оперативного лечения, в то время как остальные 7 больных живы по настоящее время без признаков прогрессирования заболевания.

При сравнении кариотипа пациентов при двустороннем раке почек с таковым при одностороннем процессе выявляется сходность генетических нарушений, что может говорить в пользу единого характера возникновения новообразований. Так, по данным большинства авторов, для стандартного светлоклеточного рака почки наиболее характерны мутации (делеции) 3p хромосомы – до 70% всех случаев [1, 3, 6, 8]. В нашем исследовании мутации 3p хромосомы

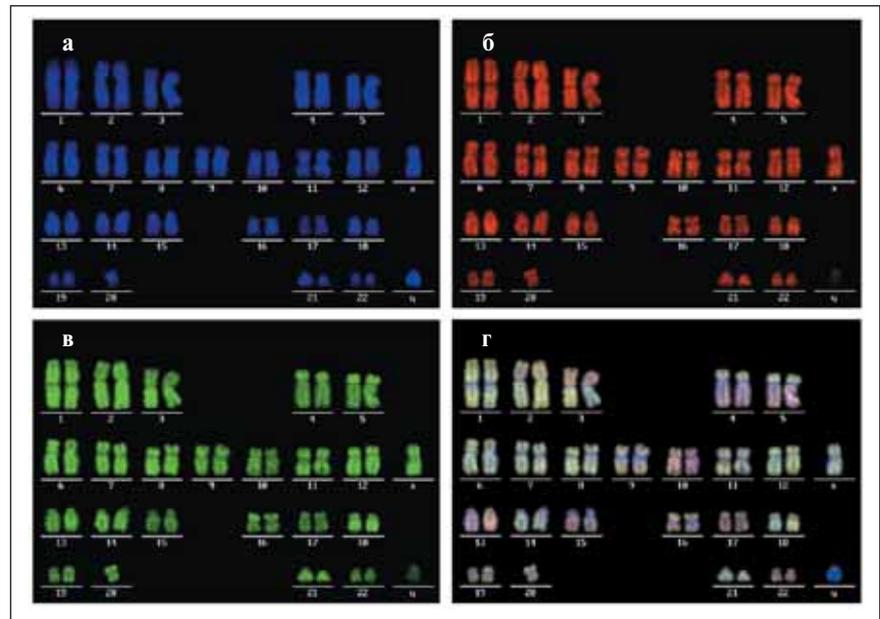


Рис. 5. Цветные изображения кариограмм

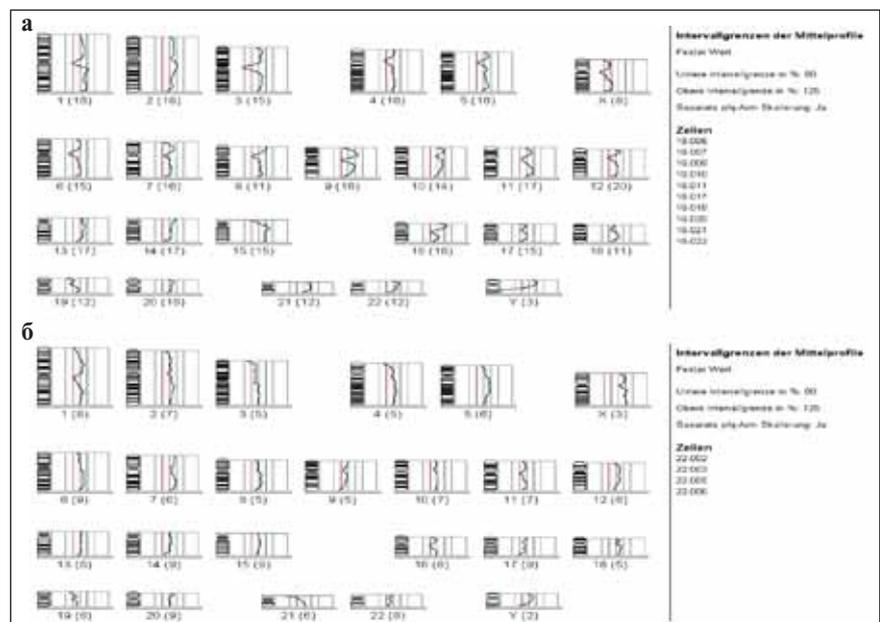


Рис. 6. Суммарные CGH-кариограммы для двух случаев (а, б)

имели место в 62,5% случаев. Данное наблюдение в очередной раз подтверждает теорию о ключевой, базисной роли мутации короткого плеча 3-й хромосомы в канцерогенезе почечноклеточного рака. В то же время для светлоклеточного одностороннего рака почки не характерно повреждение 10, 13, 14, 15, 16 и 18-й хромосом.

Выявленные нами хромосомные aberrации, вероятно, требуют пересмотра отношения к билатеральному раку почек как к метастатическому процессу, несмотря на полученные данные о еди-

Сводные данные выявленных хромосомных нарушений

Пациент	Пол	Н а р у ш е н и я		Общая
		справа	слева	
1	М	4q,5q,8p,15p, 18q	18q	18q
2	М	3pq,18p	16p, 18p	18p
3	М	2q18p	2q7q18p	2q18p
4	М	11pq	3p, 9q	—
5	М	3p, 9q	3p, 9q	3p9q
6	М	3p,7q	1q, 2p, 4p, 5q, 7q, 11q	7q
7	М	12q, 8p	8p	8p
8	Ж	3p, 10,14q,16q	3p, 13q, 16q	3p16q

ной клональности опухоли. Результаты контрольных обследований этой группы больных демонстрируют высокую 5-, 10-летнюю выживаемость, значительно превышающую таковую при метастатическом процессе. Более вероятно, что в данном случае мы имеем подтверждение теории о единстве опухолевого процесса с одномоментным и, что наиболее важно, однотипным поражением парного органа. Возможно, что развитие опухолей единой клональности идет интенсивно, т.е. происходит рост опухоли в пределах пораженного органа, в то время как разная клональность опухолевых узлов говорит в пользу экстенсивного, активно развивающегося процесса. И в этом случае, очевидно, необходим более тщательный диагностический поиск отдаленных метастатических узлов, возможно, целесообразно назначение профилактической иммунотерапии.

Выводы

Применение генетических исследований в онкологии имеет огромный научный и, что наиболее важно, клинический потенциал. Такие особенности методики, как абсолютная точность верификации диагноза по характерным хромосомным aberrациям, небольшой объем опухолевой ткани, требуемый для исследования, позволяют использовать генетическое исследование как на предоперационном, так и на послеоперационном этапах. Безусловно, генетический анализ лишь 8 случаев не позволяет экстраполировать полученные результаты на всех больных с данной патологией, однако прослеживается интересная тенденция, которая может быть использована в практической медицине как для верификации характера онкологического процесса, так и для уточнения прогноза конкретного пациента, определения необходимости в проведении адьювантного лечения и др.

Литература

1. Базов И.В., Казубская Т.П., Ермилова В.Д. и др. Картирование аллельных делеций на коротком плече хромосомы 3 человека в опухолях почки. Мол биол 2001;35(3)404–12.
2. Bentz M., Bergerheim U.S., Li C. et al. Chromosome imbalance in papillary renal cell carcinoma and first cytogenetic data of familial cases analyzed by comparative genomic hybridization. Cytogenet Cell Genet 1996;75:17–21.
3. Cohen A.J., Li P.B., Berg S. et al. Hereditary renal cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. N Engl J Med 1979;301:592–5.
4. Costello J.F., Plass Ch. Methylation matters. J Med Genet 2001;38:285–303.
5. Kallioniemi A., Kallioniemi O., Sudar D. et al. Comparative genomic hybridization: a powerful new method for cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992;258:818–21.
6. Kito H., Suzuki H., Igarashi T. et al. Distinct patterns of chromosomal losses in clinically synchronous and asynchronous bilateral renal cell carcinoma. J Urol 2002;(168):2637–40.
7. Kovacs G., Tory K., Kovacs A. Development of papillary renal cell tumours is associated with loss of Y-chromosome-specific DNA sequences. J Pathol 1994;173:39.
8. Miyazaki T., Yamashita Y., Yoshimatsu S. et al. Renal cell carcinomas in von Hippel-Lindau disease; tumor detection and management. Comput Med Imaging Graph 2000;24(2):105–13.
9. Speicher M.R., Schoell B., du Manoir S. et al. Specific loss of chromosomes 1,2,6,10,13,17 and 21 in chromophobe renal cell carcinoma revealed by comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1994;145:356–64.
10. van den Berg A., Buys C.H. Involvement of multiple loci on chromosome 3 in renal cell cancer development. Genes Chromosome Cancer 1997;19(2):59–76.
11. Zambrano N.R., Lubensky I.A., Merino M.J. et al. Histopathologic and molecular genetics of renal tumors: towards unification of classification system. J Urol 1999;162:1246–58.