

В.Г. Дубинина, А.И. Рыбин, О.В. Кузнецова

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ MLH 1, MSH 2 И CAS 20Q13 В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПЛАТИНОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАКА ЯИЧНИКОВ

Одесский национальный медицинский университет, Украина

Реферат. В статье проведен сравнительный анализ чувствительности пациенток с раком яичников стадии IC-IIIС к адъювантной терапии препаратами платины в зависимости от наличия либо отсутствия мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13. Обследовано 106 пациенток с раком яичников, проходивших лечение на базах кафедры онкологии Одесского национального медицинского университета. Определение мутаций проводилось с помощью метода «SNP-экспресс». Авторами выявлена достоверная отрицательная корреляция между носительством мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13 и рефрактерностью злокачественных опухолей яичников к химиотерапии препаратами платины. Мутации указанных генов встречались достоверно чаще у пациенток с чувствительным к платине раком яичников.

Ключевые слова: рак яичников, платина, платинорезистентность, прогноз, мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13, лечение

Несмотря на то, что рак яичников (РЯ) относится к числу наиболее чувствительных к химиотерапии опухолей, до 30% пациенток с данным заболеванием являются первично-резистентными к платиновой химиотерапии. Даже при выполнении оптимальной циторедуктивной операции и дальнейшем назначении химиотерапии препаратами платины (химиотерапия первой линии) с достижением эффекта полной регрессии и нормализации уровней опухолевых маркеров, 5-летняя выживаемость больных РЯ III стадии составляет 20-25 %, а IV стадии – не превышает 10%. Это означает, что, несмотря на отсутствие клинических признаков заболевания, у подавляющего большинства больных в первые 2-3 года после окончания химиотерапии первой линии следует ожидать прогрессирование заболевания [1, 2, 4, 5, 7, 9-11, 13].

Эффективность платиновых производных при раковых опухолях связана с повреждением ДНК опухолевой клетки, в результате чего формируются, так называемые, цисплатин-ДНК-аддукты, которые в свою очередь блокируют репликацию, транскрипцию и, как результат, клеточную пролиферацию. Клетки с повышенной активностью восстановления ДНК заведомо резистентны к препаратам платины, что подтверждает важность ингибирования репликации ДНК. Некоторое время назад определенное внимание ученых заслужила и митохондриальная ДНК, которая более чувствительна к повреждающему действию платины, чем ядерная. Резистентность к препаратам платины рассматривают как многофакторное явление, обеспечиваемое снижением внутриклеточного накопления цитостатика, повышением активности глутатиона и металлотионеинов,

повышением репарации поврежденной ДНК и рядом других процессов [3, 5, 6, 8, 12].

Являются ли данные процессы заранее прогнозируемыми, а следовательно, и предотвратимыми? Существуют ли генетически обусловленные закономерности чувствительности РЯ к препаратам платины?

Целью настоящей работы явился сравнительный анализ чувствительности пациенток с раком яичников стадии IC-IIIС к адъювантной терапии препаратами платины в зависимости от наличия либо отсутствия мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13.

Материалы и методы

С 2007 года на базе отделения онкогинекологии Одесского областного онкологического диспансера был проведен сравнительный анализ 74 клинических случая рака яичников стадии IC-IIIС, которым была выполнена оптимальная либо субоптимальная циторедуктивная операция в объеме пангистерэктомии I типа, оментэктомии с последующей адъювантной химиотерапией препаратами платины. Во всех случаях гистологическим вариантом РЯ была аденокарцинома. Отбор больных для исследования осуществлялся по принципу «случай-контроль». До начала специального лечения всем пациенткам было проведено анкетирование с целью определения клинико-anamnestических характеристик заболевания, а также оценка наличия мутаций MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13. Критерием деления пациенток на группы была выбрана чувствительность РЯ к препаратам платины. Первую (основную) группу составили 73 пациентки с прогрессированием заболевания на фоне проведения послеоперационной платиновой химиотерапии. Вторую (контрольную) группу составили 33 пациентки с отсутствием рецидива заболевания в течение трех лет наблюдения. Исследование проводилось по схеме «случай-контроль». Критерием резистентности к препаратам платины служила регистрация рецидива РЯ путем выполнения компьютерной томографии органов малого таза и определения уровней СА-125 и HE4 в крови.

В лаборатории молекулярной генетики клиники Одесского национального медицинского университета определяли мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13. Определение мутаций проводилось с помощью метода «SNP-экспресс». Система «SNP-экспресс» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека. Анализ подвержалась геномная ДНК человека. С образцом

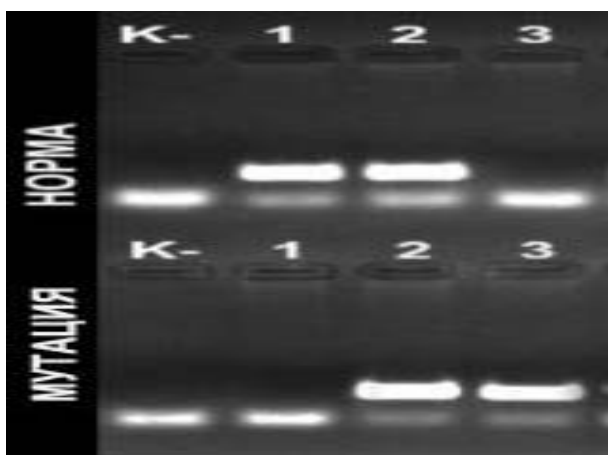


Рис. Интерпретация результатов анализа, где: К- отрицательный контрольный образец; 1 – нормальная гомозигота; 2 – гетерозигота; 3 – мутантная гомозигота.

выделенной ДНК параллельно проводились две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Результаты анализа позволяют дать три типа заключений: нормальная гомозигота; гетерозигота; мутантная гомозигота (рис. 1).

Исследование проводилось методом ПЦР. Использовались пробирки для проведения амплификации вместимостью 0,5 мл (или 0,2 мл) в соответствии с количеством анализируемых проб плюс отрицательный контроль. Для каждой пробы готовились 2 пробирки: Н (норма) и М (мутация). Из компонентов комплекта готовили рабочие смеси реагентов для амплификации из расчета на 1 пробу: 17,5 мкл разбавителя, 2,5 мкл реакционной смеси, 0,2 мкл Taq-полимеразы. Готовили две рабочие смеси: с реакционной смесью Н и с реакционной смесью М.

Добавляли по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси во все соответствующие пробирки, подготовленные для амплификации. По 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы вносили в пробирку с рабочей амплификационной смесью Н и в про-

Таблица 1. Программа амплификации при исследовании мутаций генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13

Т,С°	Время	Число циклов
94	Pause	
93	1 мин	1
93	10 сек	
64	10 сек	35
72	20 сек	
72	1 мин	1
10	Storage	

Таблица 2. Распределение стадий РЯ у больных исследуемых групп, абс. (%)

Стадия РЯ	Основная группа (n=73)	Контрольная группа (n=33)	P
IC	5 (6,8%)	2 (6,1%)	> 0,05
IIA	3 (4,1%)	2 (6,1%)	> 0,05
IIB	2 (2,7%)	1 (3,0%)	> 0,05
IC	4 (5,5%)	2 (6,1%)	> 0,05
IIIA	19 (26,0%)	8 (24,2%)	> 0,05
IIIB	11 (15,1%)	6 (18,2%)	> 0,05
IIIC	29 (39,7%)	12 (36,4%)	> 0,05

бирку с рабочей амплификационной смесью М под слой масла. В качестве отрицательного контрольного образца вносится разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси. Пробирки центрифугировали в течение 3-5 секунд при 1500–3000 об/мин при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортексе. Переносили пробирки в прогретый до температуры +94°С (установившаяся температура в режиме Пауза) программируемый термостат (Плащечный амплификатор С-1000 «BioRad») и проводили амплификацию по следующей программе:

- детекция продуктов амплификации (табл. 1).
- разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза

В аппарате для электрофореза готовили ТАЕ буфер, на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз (рН=8,3). Готовили 3% агарозу из расчета на 1 гель: 1,5 г агарозы 1 мл 50х ТАЕ буфера и 55 мл дистиллированной воды. Приготовленную смесь расплавляли в СВЧ-печи на небольшой мощности. В 50 мл расплавленной агарозы добавляли 5 мкл 1% раствора бромистого этидия. Наносили в карманы геля по 10-15 мкл амплификата в последовательности, соответствующей нумерации проб. Подключали электрофоретическую камеру к источнику питания и задавали напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля. Проводили электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществляли визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя прошла старта 1,5-2 см (оптимальное время разгонки—17 минут). Для визуализации результатов электрофореза гель из формы переносили в прибор видеодокументации гелей, анализировали результаты. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос под УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

Результаты и обсуждения
Средний возраст пациенток составил 55±7,3

Таблица 3. Клиническая характеристика групп больных

Рассматриваемый критерий	I группа (основная) n=73		II группа (контрольная) n=33		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Профессиональные вредности	50	68,5	21	63,6	>0,05
Нарушения индекса массы тела	34	46,6	15	45,5%	>0,05
Нарушения менструальной функции	40	54,8	16	48,9	>0,05
Отягощенный репродуктивный анамнез	19	26,0	7	21,2	>0,05
Отягощенный генеалогический анамнез	59	80,8	16	48,5	<0,05
Сопутствующая эндокринная патология	19	26,0	7	21,2	>0,05
Сопутствующая патология молочных желез	40	54,8	13	39,4	<0,05
Сопутствующая патология органов желудочно-кишечного тракта	29	39,7	11	33,3	>0,05

лет и достоверно не отличался между группами. Сравнительный анализ распределения РЯ по стадиям в обеих группах показал отсутствие достоверных различий между исследуемыми группами (табл. 2).

Анализ клинико-анамнестических характеристик пациенток обеих групп показал достоверное

Таблица 4. Мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13 в исследуемых группах, абс. (%)

Исследуемая мутация	Основная группа (n=73)	Контрольная группа (n=33)	P
Мутация-1 гена MLH 1	7 (9,6%)	8 (24,2%)	<0,05
Мутация-1 гена MSH 2	8 (10,6%)	8 (24,2%)	<0,05
Мутация-1 гена CAS 20q13	5 (6,8%)	9 (27,3%)	<0,05

отсутствие различий по всем исследуемым показателям (табл. 3), кроме отягощенного генеалогического анамнеза и наличия сопутствующей патологии молочных желез. Достоверно более высокие значения указанных факторов в основной группе свидетельствуют о взаимосвязи наследственной предрасположенностью к возникновению и развитию РЯ и рефрактерностью опухоли.

Таким образом, полученные данные позволяют говорить о том, что исследуемые группы были сформированы рандомизированно и могут быть сравнимы.

Сравнительный анализ мутаций в генах MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13 показал наличие достоверных различий в исследуемых группах (табл. 4).

Так, мутация-1 гена MLH 1 была выявлена у 7 (9,6%) пациенток основной группы и 8 (24,2%) пациенток группы контроля. Мутация-2 гена MSH 2 была обнаружена у 8 (10,6%) пациенток первой группы и 8 (24,2%) женщин группы контроля. Мутация-1 гена CAS 20q13 выявлена у 5 (6,8%) больных первой группы и у 9 (27,3%) больных группы контроля.

Таким образом, нами выявлены различные варианты мутаций генов MLH 1 (14,2%), MSH 2 (15,1%) и CAS 20q13 (13,2%) у пациенток с раком яичников. В исследуемых группах не было выявлено достоверной корреляции между стадией заболевания, клинико-анамнестическими характеристиками больных раком яичников и чувствительностью опухоли к препаратам платины. Нами выявлена достоверная отрицательная корреляция между носительством мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13 и рефрактерностью злокачественных опухолей яичников к химиотерапии препаратами платины. Мутации указанных генов встречались достоверно чаще у пациенток с чувствительным к платине раком яичников. По нашим данным, наследственная предрасположенность к возникновению рака яичников влияет на чувствительность либо резистентность опухоли к химиотерапии препаратами платины.

V.G. Dubinina, A. I. Rybin, O.V. Kuznetsova

Analysis of MLH1, MSH2 and CAS 20q13 mutations in platinum refractory patients with the ovarian cancer

The article provides a comparative analysis of the sensitivity of patients with ovarian cancer stage IIIA-IIIIC to adjuvant therapy with platinum, depending

on the presence or absence of mutations in the genes MLH 1, MSH 2 and CAS 20q13. The study involved 106 patients with ovarian cancer who were treated at the bases of the Department of Oncology of the Odessa National Medical University. Determination of mutations was performed using the method of «SNP- Express». The authors found significant negative correlation found between carriage of gene mutations MLH 1, MSH 2 and CAS 20q13 and malignant ovarian tumors refractory to platinum-based chemotherapy. Mutations in these genes occurred significantly more often in patients with platinum-sensitive ovarian cancer (University clinic. — 2014. — Vol.10, №1. — P. 22-25).

Key words: ovarian cancer, platinum, platinumrefractority, gene mutations MLH 1, MSH 2 and CAS 20q13.

В.Г. Дубініна, А.І. Рибін, О.В. Кузнецова

Прогностичне значення мутацій генів MLH1, MSH2 та CAS20q13 у визначенні платиначутливості раку яєчників

У статті проведено порівняльний аналіз чутливості пацієток з раком яєчників стадії IIIA-IIIС до ад'ювантної терапії препаратами платини в залежності від наявності або відсутності мутації генів MLH 1, MSH 2 і CAS 20q13. Обстежено 106 пацієток з раком яєчників, які проходили лікування на базах кафедри онкології Одеського національного медичного університету. Визначення мутацій проводилося за допомогою методу «СНП-експрес». Авторами виявлена вірогідна негативна кореляція між наявністю мутацій генів MLH 1, MSH 2 і CAS 20q13 і резистентністю злоякісних пухлин до терапії препаратами платини. Мутації зазначених генів зустрічалися достовірно частіше у пацієток з чутливим до платини раком яєчників (Університетська клініка. — 2014. — Т.10, №1. — С. 22-25).

Ключові слова: рак яєчників, платина, платино-рефрактерність, мутації генів MLH 1, MSH 2 і CAS 20q13.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бохман Я.В.* Лекции по онкогинекологии. — М.: МИА, 2007. — 304 с.
2. *Важенни А.В., Жаров А.В., Шимоткина И.Г.* Актуальные вопросы клинической онкогинекологии М.: СТРОМ, 2010. — 128 с.
3. *Винокуров В.Л.* Рак яичников: закономерности метастазирования и выбор адекватного лечения больных. — СПб.: Фолиант, 2004. — 333с.
4. Генетика пухлин жіночих репродуктивних органів / За ред. В.М. Запорожана. — Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2004. — 332 с.
5. *Дубинина В.Г., Рыбин А.И., Лукьянчук О.В., Кузнецова О.В.* Анализ мутаций генов BRCA-1 и BRCA-2 у платинорефрактерных больных раком яичников // Вісник морської медицини. — 2013. - №1. — С. 46-52.
6. Клиническая онкогинекология / под ред. В.П. Козаченко. — М.: Медицина, 2005. — 376с.: ил.
7. Лекции по онкогинекологии / под редакцией М. И. Давыдова, В. В. Кузнецова, В. М. Нечушкиной. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 432 с.
8. Онкология: национальное руководство / Под ред. В.И. Чиссова, М.И. Давыдова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1072 с.
9. *Урманчева А. Ф., Тюляндина С. А., Моисеенко В. М.* Практическая онкогинекология: избранные лекции. - СПб.: «ТОММ», 2008. — 400 с.
10. *Dubinina V.G., Rybin A.I., Lysenko M.A.* Genetic features of platinum-resistant ovarian cancer patients / China Journal of modern medicine, 2014 (15). - P. 1-4.
11. *Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, et al.* Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol.* 2009; 3:97-137.
12. *Malander S, Rambech E, Kristoffersson U, et al.* The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006; 101:238-43.
13. *Shulman LP, Dungan JS.* Cancer genetics: risks and mechanisms of cancer in women with inherited susceptibility to epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Res.* 2010;156:69-85.

Надійшла до редакції: 13.12.2013