

Одесский национальный медицинский университет

АКТИВНОСТЬ БЕЛКА p53 У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПРЕПАРАТАМ ПЛАТИНЫ



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

Адрес:

Рыбин Андрей Игоревич
65023, Одесса, пер. Валиховский, 2
Одесский национальный медицинский университет
Тел.: (067) 785-25-40, (048) 720-26-17
E-mail: Andriy.Rybin@gmail.com

Ключевые слова: рак яичника, химиотерапия, белок p53, платинорезистентность, платиночувствительность.

В статье проведен сравнительный анализ общей и местной активности белка p53 у больных раком яичника в зависимости от чувствительности опухоли к препаратам платины. Для этого обследовано 100 пациенток с аденокарциномой яичника стадии IIIA–IIIC, которым после выполнения оптимальной либо субоптимальной циторедуктивной операции проводили курс адъювантной химиотерапии с включением препаратов платины в стандартном режиме. Авторами показано, что активность белка p53 в сыворотке крови больных раком яичника, чувствительным к препаратам платины, достоверно выше таковой в группах с платинорезистентной и платинорефрактерной злокачественной опухолью яичника. Кроме того, выявлена достоверно более высокая местная активность белка p53 у пациенток с раком яичника, чувствительным к препаратам платины, по сравнению с таковой в группах с платинорезистентным и платинорефрактерным раком яичника.

Несмотря на то что рак яичника (РЯ) относится к числу наиболее чувствительных к химиотерапии опухолей, у около 40% пациенток это заболевание является первично резистентным 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 уровня опухолевых маркеров, 5-летняя выживаемость больных РЯ III стадии составляет 20–25%, а IV стадии — не превышает 10%. Это означает, что, невзирая на отсутствие клинических признаков заболевания, у большинства пациенток в первые 2–3 года после окончания химиотерапии первой линии следует ожидать прогрессирование опухолевого процесса. Частота объективного эффекта колеблется в пределах 10–25%, а медиана общей выживаемости составляет 7–18 мес [1, 2, 3, 7, 11, 13].

В зависимости от сроков прогрессирования заболевания принято выделять следующие типы опухолей: платинорефрактерные (опухоли, прогрессирующие во время химиотерапии первой линии с включением препарата платины), платинорезистентные (опухоли, прогрессирующие в течение 6 мес после окончания химиотерапии первой линии с включением препарата платины) и платиночувствительные (опухоли, прогрессирующие через 6 мес и более после окончания химиотерапии первой линии) [3, 7, 12, 18].

Устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам — одна из важных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Механизмы резистентности клеток к цитостатикам представляют существенный интерес с позиции не только лечения больных с опухолями, но и исследования защитных систем живой клетки, ограждающих ее от повреждений.

Лекарственную устойчивость (ЛУ) опухолевых клеток можно разделить на предсуществующую (до применения лечения) и приобретенную. При предсуществующей (intrinsic) ЛУ обычно все клетки новообразования устойчивы к терапии. Резистентность клеток к лекарственному препарату может, в частности, определяться разной тканевой принадлежностью клеток. Так, известно, что опухоли головного мозга резистентны к большинству цитостатиков из-за наличия гематоэнцефалического барьера. Клетки системы кроветворения разной дифференцировки различаются по степени чувствительности к химиопрепаратам, следовательно, происходящие из них новообразования могут иметь разную степень ЛУ. Предсуществующая ЛУ может определяться также генетическим изменением, вызывающим данное новообразование. Показано, например, что хромосомная транслокация 9;22 и появление сливного белка BCR/ABL, лежащие в основе хронического миелолейкоза, приводят к выключению апоптоза и могут определить ЛУ [6, 8, 11, 18, 19].

Приобретенная ЛУ возникает вследствие введения цитостатических препаратов. В популяциях опухолевых клеток в результате воздействия цитостатика могут появиться редкие генетические варианты резистентных клеток, которые впоследствии размножаются в том случае, если получают селективное преимущество.

Селективное преимущество обеспечивает клеткам не только устойчивость к действию лекарства, но и другие признаки клетки, такие как характер размножения, изменение чувствительности к факторам роста и т. д. Существуют также так называемые адаптационные изменения, в условиях которых большинство клеток в популяции оказываются устойчивыми к воздействию за счет временной активации защитных механизмов.

ЛУ может возникнуть к одному и/или нескольким препаратам. Примером первого типа ЛУ может служить резистентность к антиметаболитам. Так, например, 6-меркаптопурин и 6-тиогуанин активизируются гипоксантинфосфорибозилтрансферазой (ГФРТ), и снижение или полное исчезновение активности этого фермента в мутантных клетках приводит к тому, что препарат не активируется и не вызывает гибель опухолевых клеток. Множественной ЛУ называют резистентность клеток к нескольким (многим) лекарственным препаратам, различающимся по химической структуре и механизму действия. Показано, что воздействие на культуры клеток одного препарата круга множественной ЛУ может определить устойчивость клетки (перекрестную резистентность) к другим препаратам, с которыми клетка ранее не встречалась [6, 10, 14, 17].

Важнейшим элементом ответа клетки на стрессорные воздействия, в том числе на влияние химиотерапевтических препаратов, является белок p53 и регулируемые им гены.

Нормальный p53 активируется в ответ на различные повреждающие клетку воздействия, что приводит к остановке пролиферации клеток или апоптозу. Таким образом, либо поврежденные клетки удаляются из популяции, либо у них появляется возможность репарировать поврежденную ДНК. Изменения p53, весьма частые в опухолях, обуславливают нарушения нормальной функции кодируемого ими белка и нарушение способности клеток вступать в апоптоз или останавливаться в некоторых сверочных точках клеточного цикла в ответ на повреждение. Химиотерапевтические препараты вызывают чаще всего апоптоз опухолевых клеток или длительную остановку их движения по циклу. Так, нарушение функции p53 а ргоіг может вызывать изменение чувствительности опухолевых клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов,

в частности приводить к множественной ЛУ [6, 7, 11].

Учитывая вышесказанное, исследование общей и местной активности белка p53, являющееся отражением экспрессии гена p53, у больных РЯ является актуальным в современной онкологии.

Целью работы явилось изучение общей и местной активности белка p53 у больных РЯ в зависимости от чувствительности опухоли к препаратам платины.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения указанной цели было обследовано 100 пациенток с аденокарциномой яичника IIIA–IIIC стадии, проходивших лечение в отделениях онкогинекологии и полихимиотерапии Одесского областного онкологического диспансера с 2009 г. У всех больных диагноз был верифицирован гистологически. Согласно отработанной тактике ведения на первом этапе специального лечения у всех пациенток проводили хирургическое вмешательство. Была выполнена оптимальная либо субоптимальная циторедуктивная операция с последующим назначением адьювантной химиотерапии с включением препаратов платины в стандартном режиме [9, 13]. После окончания специального лечения всем пациенткам проводили оценку эффекта каждые 3 мес. На основании динамического наблюдения за больными, полученного объективного ответа и сроков возникновения рецидива всех пациенток распределили на 3 группы. Первую группу составили 45 женщин с чувствительной к платиновой химиотерапии аденокарциномой яичника; вторую — 30 больных с рефрактерным к платине РЯ; в третью группу вошли 25 пациенток с резистентной к платине карциномой яичника. Распределение пациенток в группы проходило по методике «случай-контроль». Забор материала проводили до начала курсов полихимиотерапии.

Материалом для исследования иммуноферментным методом служили периферическая кровь и ткань опухоли яичника (лизат клеток). Для количественного определения протеина p53 были использованы иммуноферментные наборы (Bender MedSystems, ELISA). Для

приготовления лизата клеток использован следующий протокол экстракции. Суспензию клеток осадили центрифугированием. Клетки промыли 1 раз PBS. Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре при аккуратном шейкировании. Экстракты перенесли в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали при 1000 об. в течение 15 мин. Принцип количественного определения протеина p53 основан на методе твердофазного иммуноферментного сэндвич-анализа. Антитела, специфичные к p53, сорбированы в ячейках планшета. Неизвестные образцы, стандарты и контрольные образцы вносят в ячейки планшета. Вслед за этим добавляют биотинилированные вторые антитела. В течение первой инкубации один сайт p53-антигена связывается свободно с иммобилизованными антителами, и другой сайт p53 связывается с растворенными биотинилированными антителами. После удаления избытка вторых антител в ячейки вносят конъюгат стрептавидин-пероксидазы. Конъюгат связывается с биотинилированными антителами, формируя сэндвич-комплекс. После второй инкубации и промывки из ячеек удаляют несвязавшийся ферментный конъюгат и в ячейки добавляют субстратный раствор, который взаимодействует с ферментным комплексом с образованием окрашенного раствора. Интенсивность окраски, измеренная на длине волны 450 нм, прямо пропорциональна концентрации p53, присутствующего в образцах. Концентрацию p53 в образцах определяют по стандартной кривой, построенной по 7 разведениям стандарта p53. Полученные результаты подвергались статистической обработке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст пациенток всех трех групп составил 52,8±6,6 года и достоверно не различался между группами.

Анализ основных клинико-анамнестических характеристик показал следующее (табл. 1).

Анализируя полученные нами результаты, следует отметить, что, несмотря на данные ряда авторов о влиянии наличия у пациенток с РЯ асцита, сопутствующей эндокринной патологии и доброкачественных опухолей яичника

Таблица 1. Клинико-анамнестические характеристики больных исследуемых групп

Показатель	I группа (N=45)		II группа (N=30)		III группа (N=25)		Достоверность, p
	n	%	n	%	n	%	
Асцит	29	64,4	21	70,0	15	60,0	>0,05
Отягощенный семейный анамнез	31	68,9	7	23,3	6	24,0	<0,05
Профессиональные вредности	21	46,6	12	40,0	11	44,0	>0,05
Патология органов желудочно-кишечного тракта	9	20,0	8	26,7	5	20,0	>0,05
Бесплодие в анамнезе	11	24,4	8	26,7	8	32,0	>0,05
Кисты яичников в анамнезе	18	40,0	14	46,7	14	56,0	>0,05
Сопутствующая эндокринная патология	15	33,3	9	30,0	8	32,0	>0,05

в анамнезе на чувствительность опухоли к препаратам платины [15, 18], достоверных различий по указанным показателям не выявлено. В то же время в группе пациенток с платиночувствительными опухолями показатель наличияотягощенного семейного анамнеза был достоверно выше такового в группах с платинорезистентным и платинорефрактерным РЯ, что подтверждается данными литературы [16], а также нашими собственными данными [5] о большей чувствительности аденокарциномы яичника к препаратам платины у женщин с наличием мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Наши предположения о возможном влиянии на чувствительность РЯ к препаратам платины таких показателей, как сопутствующая опухолевая патология органов желудочно-кишечного тракта, бесплодие и работа с профессиональными вредностями в анамнезе, не подтвердились, не показав достоверных различий между исследуемыми группами.

Учитывая изначальную выборку пациенток с РЯ (только III стадия), мы предположили возможное влияние размеров очагов канцероматоза и опухолевого поражения большого сальника на чувствительность аденокарциномы яичника к препаратам платины, однако достоверных различий по указанному признаку в исследуемых группах также не получено.

Сравнительный анализ распределения больных РЯ по стадиям в исследуемых группах также не выявил достоверных различий и закономерностей (табл. 2).

Полученные результаты подтверждают рандомизированность проведенного отбора пациенток в исследуемые группы, а также коррелируют с данными мировых канцер-регистров о распределении по стадиям РЯ в популяции [4, 9]. Таким образом, группы могут быть сравнимы по исследуемому показателю.

Сравнительный анализ концентрации р53 в сыворотке крови и ткани пациенток исследуемых групп показал существование достоверных различий (табл. 3).

В группе пациенток с платиночувствительным РЯ как общая, так и местная активность белка р53 была достоверно выше таковой в группе боль-

ных с платинорезистентными и платинорефрактерными опухолями яичника. При этом отмечалась положительная корреляция между активностью белка р53 в сыворотке крови и яичниковой ткани.

По нашему мнению, повышение активности белка р53 в первой группе исследования объясняется следующими. В число индукторов, активирующих нормальный р53, входят агенты, разными способами повреждающие ДНК, вызывающие изменения пула рибонуклеотидов, модификацию редокс-потенциала (например накопление атомов активного кислорода в клетке, разрушение веретена деления и др). Поскольку механизмы действия ряда противоопухолевых препаратов связаны с этим воздействием на клетку, очевидно, многие цитостатики должны являться активаторами р53. Действительно, большое исследование Национального института рака США, включившее 60 линий культивируемых опухолевых клеток и более 100 противоопухолевых препаратов, выявило прямую корреляцию между статусом р53 в клетках и их чувствительностью к цитотоксическому действию лекарств. Клетки с мутантным геном р53 чаще всего были более резистентными к препаратам с разным механизмом действия (например к цисплатину и 5-флуороурацилу), чем клетки, обладавшие геном р53 дикого типа. Эти данные свидетельствуют о существенной роли белка р53 в определении чувствительности злокачественных новообразований к химиотерапии. Очевидно, однако, что эта проблема не так проста. Исследования регуляции р53 показывают, что характер модификаций, активирующих этот белок в ответ на стимулы, зависит от: а) стрессорного воздействия; б) тканевой и видовой принадлежности клеток; в) типа аминокислотной замены в мутантном гене р53. Различные повреждающие воздействия не только разными способами активируют р53, но и эта активация осуществляется через различные сигнальные пути. Эти, а возможно, и другие особенности регуляции гена/белка р53 определяют существенные различия ответа разных опухолевых клеток на одни и те же воз-

действия и расхождения в результатах влияния на р53 одних и тех же клеток повреждающих агентов.

ВЫВОДЫ

В исследуемых группах не выявлено достоверной корреляции между стадией заболевания, клинико-анамнестическими характеристиками больных РЯ и чувствительностью опухоли к препаратам платины.

Наличие асцита, сопутствующей эндокринной патологии и опухолей яичника в анамнезе у больных РЯ не влияет на чувствительность опухоли к препаратам платины.

По нашим данным, активность белка р53 в сыворотке крови больных РЯ, чувствительным к препаратам платины, была достоверно выше таковой в группах с платинорезистентным и платинорефрактерным РЯ.

Нами выявлена достоверно более высокая местная активность белка р53 у пациенток с РЯ, чувствительным к препаратам платины, по сравнению с таковой в группах с платинорезистентным и платинорефрактерным РЯ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксель М.А., Баринов В. В., Бокина Л.И. (2009) Лекции по онкогинекологии. МЕДпресс-информ, Москва, 425 с.
2. Бохан Я.В. (2007) Лекции по онкогинекологии. МИА, Москва, 304 с.
3. Важенин А.В., Жаров А.В., Шимоткина И.Г. (2010) Актуальные вопросы клинической онкогинекологии. СТРОМ, Москва, 128 с.
4. Запорожан В.М. (2004) Генетика пухлин жіночих репродуктивних органів. Одес. держ. мед. ун-т, Одеса, 332 с.
5. Дубинина В.Г., Рыбин А.И., Лукьянчук О.В., Кузнецова О.В. (2013) Анализ мутаций генов *BRCA-1* и *BRCA-2* у платинорефрактерных больных раком яичников. Вісник морської медицини, 1: 46–52.
6. Заридзе Д.Г. (2004) Канцерогенез. Медицина, Москва, 576 с.
7. Козаченко В.П. (2005) Клиническая онкогинекология. Медицина, Москва, 376 с.
8. Корман Д.Б. (2006) Основы противоопухолевой химиотерапии. Практическая медицина, Москва, 503 с.
9. Чиссов В.И., Давыдов М.И. (2008) Онкология: национальное руководство. ГЭОТАР-Медиа, Москва, 1072 с. Переводчикова Н.И. (2005) Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Практическая медицина, Москва, 698 с. Урманчеева А.Ф., Тюляндина С.А., Моисеенко В.М. (2008) Практическая онкогинекология: избранные лекции. ТОММ, СПб., 400 с.
10. Чу Э., де Вита В.Т. (2008) Химиотерапия злокачественных новообразований (перевод с англ.). Практика, Москва, 447 с.
11. Щепотин И.Б., Бондарь Г.В., Ганул В.Л. (2006) Алгоритмы современной онкологии. Книга плюс, Киев, 304 с.
12. Ambudakar S.V., Dey S., Hrycyna C.A. et al. (1999) Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 39: 361–398.
13. Chu G. (2004) Cellular responses to cisplatin. J. Biol. Chem., 279: 787–790.
14. Lynch H.T., Casey M.J., Snyder C.L. et al. (2009) Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. Mol. Oncol., 3: 97–137.
15. Malander S., Rambech E., Kristofferson U. et al. (2006) The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. Gynecol. Oncol., 101: 238–43.
16. Robert J. (2001) Resistance to cytogenetic agents. Curr. Opin. Pharmacol., 1: 353–357.
17. Shulman L.P., Dungan J.S. (2010) Cancer genetics: risks and mechanisms of cancer in women with inherited susceptibility to epithelial ovarian cancer. Cancer Treat. Res., 156: 69–85.

Таблица 2. Распределение по стадиям больных исследуемых групп

Стадия	I группа (N=45)		II группа (N=30)		III группа (N=25)		Достоверность, p
	n	%	n	%	n	%	
IIIA	11	24,4	7	23,3	6	24,0	>0,05
IIIB	7	15,6	6	20,0	6	24,0	>0,05
IIIC	27	60,0	17	56,7	13	52,0	>0,05

Таблица 3. Активность белка р53 у больных РЯ в зависимости от чувствительности опухоли к препаратам платины

Показатель	I группа (N=45)	II группа (N=30)	III группа (N=25)	Достоверность, p
р53 в крови	9,7±1,2	5,1±1,3	2,3±0,9	<0,05
р53 в ткани	4,5±1,1	2,7±0,9	1,7±0,9	<0,05

Активність білка p53 у хворих на рак яєчника залежно від чутливості до препаратів платини*В.Г. Дубініна, А.І. Рибін, О.В. Кузнецова, О.М. Морозюк**Одеський національний медичний університет*

Резюме. У статті проведено порівняльний аналіз загальної та місцевої активності білка p53 у хворих на рак яєчника залежно від чутливості пухлини до препаратів платини. Для цього обстежено 100 пацієнток з аденокарциномою яєчника IIIA–IIIC стадії, яким після виконання оптимальної або субоптимальної циторедуктивної операції проводили курс ад'ювантної хіміотерапії із включенням препаратів платини у стандартному режимі. Авторами показано, що активність білка p53 у сироватці крові хворих на рак яєчника, чутливий до препаратів платини, була вірогідно вищою за аналогічний показник у групах із платинорезистентним і платинорефрактерним раком яєчника. Крім того, виявлено вірогідно вищу місцеву активність білка p53 у пацієнтів із раком яєчника, чутливим до препаратів платини, порівняно з активністю у групах із платинорезистентним і платинорефрактерним раком яєчника.

Ключові слова: рак яєчника, хіміотерапія, білок p53, платинорезистентність, платиночутливість.

The activity of p53 in ovarian cancer patients, depending on the sensitivity to platinum drugs*V.G. Dubinina, A.I. Rybin, O.V. Kuznetsova, O.M. Morozjuk**Odessa National Medical University*

Summary. The article provides a comparative analysis of general and local activity of the p53 protein in ovarian cancer patients, depending on tumor sensitivity to platinum drugs. For this were examined 100 patients with ovarian adenocarcinoma stage IIIA–IIIC, which after optimal or suboptimal cytoreductive surgery conducted a course of adjuvant chemotherapy with the inclusion of platinum in standard mode. The authors have shown that the activity of the p53 protein in the blood serum in patients with platinum-sensitive ovarian cancer was significantly higher than that in groups with the platinum-refractory and platinum-resistant ovarian cancer. Furthermore, revealed a significantly higher activity of a protein spot p53 in ovarian cancer patients sensitive to the platinum drugs, as compared with that in the groups with platinum-resistant and platinum-refractory ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer, chemotherapy, p53, platinum-resistance, platinum-sensitivity.