

УДК 618.11-006.6-036.22-07

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ ГЕНОВ MLH 1, MSH 2 И CAS 20Q13 У ПЛАТИНОРЕФРАКТЕРНЫХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

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

Одесский национальный медицинский университет, andrey_rybin@inbox.ru

В статье проведен сравнительный анализ чувствительности пациенток с раком яичников стадии IIIA-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, платинорефрактерность, мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13.*

Актуальность проблемы

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, 6, 8, 12, 14, 15].

Являются ли данные процессы заранее прогнозируемыми, а следовательно, и предотвратимыми? Существуют ли генетически обусловленные закономерности чув-

ствительности РЯ к препаратам платины? В доступной нам отечественной и зарубежной литературе мы не нашли точных и достоверных данных, позволяющих ответить на этот вопрос.

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

Материал и методы исследования

С 2007 года на базе отделения онкогинекологии Одесского областного онкологического диспансера был проведен сравнительный анализ 74 клинических случая рака яичников стадии IIIA-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-анамнестических 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 прогрессирующим заболеванием 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

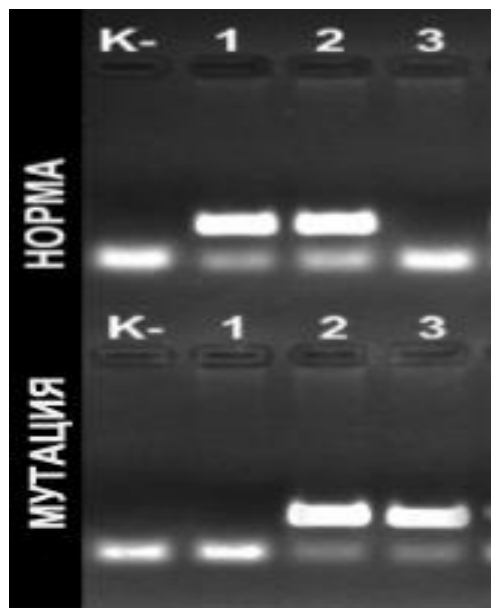


Рис. 1. Интерпретация результатов анализа, где:
 К — отрицательный контрольный образец
 1 — нормальная гомозигота;
 2 — гетерозигота;
 3 — мутантная гомозигота.

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 следующие 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. Анализу подвергается геномная ДНК чело-

Таблица 1

Программа амплификации при исследовании мутации генов MLH 1, MSH 2 и CAS 20q13

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

века. С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся 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 НОРМА и с реакционной смесью МУТАЦИЯ.

Добавили 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 НОРМА и в пробирку с рабочей амплификационной смесью МУТАЦИЯ 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. Перенесли 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 (табл. 1):

Детекция продуктов амплификации

Разделение продуктов амплификации проводилось методом горизонтального электрофореза.

В аппарате для электрофореза ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50xТАЕ в 50 раз (рН = 8,3). Готовили 3 % агарозу из расчета на 1 гель: к 1,5 г агарозы 1 мл 50x ТАЕ буфера и 55 мл дистиллированной воды. Приготовленную смесь расплавляли на электрической плите или в СВЧ-печи на небольшой мощности. Добавили 50 мл расплавленной агарозы 5 мкл 1 % раствора бромистого этидия. Наносили в карманы геля по 10-15 мкл ам-

Таблица 2

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

Стадия РЯ	Основная группа (n = 73)	Контрольная группа (n = 33)	P
IIIA	19 (26,0 %)	8 (24,2 %)	> 0,05
IIIB	15 (20,5 %)	6 (18,2 %)	> 0,05
IIIC	39 (53,4 %)	19 (57,6 %)	> 0,05

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

плификата в последовательности, соответствующей нумерации проб. Подключили электрофоретическую камеру к источнику питания и задали напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См геля. Провели электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществлялся визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя прошла от старта 1,5-2 см (оптимальное время разгонки — 17 минут). Для визуализации результатов электрофореза гель из формы перенесли в прибор видеодокументации гелей, проанализировали результаты. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос под УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

Результаты исследования

Средний возраст пациенток составил $55 \pm 7,3$ 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 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

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

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.

Выводы

1. Нами выявлены различные варианты мутаций генов MLH 1 (14,2 %), MSH 2 (15,1 %) и CAS 20q13 (13,2 %) у пациенток с раком яичников.
2. В исследуемых группах не было выявлено достоверной корреляции между стадией заболевания, клинико-анамнестическими характеристиками больных раком яичников и чувствительностью опухоли к препаратам платины.
3. 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.
4. По нашим данным, наследственная предрасположенность к возникновению рака яичников влияет на чувствительность либо резистентность опухоли к химиотерапии препаратами платины.

Литература

1. Аксель М.А., Баринов В. В., Бокина Л. И.. Лекции по онкогинекологии. — М.: МЕД-

- пресс-информ, 2009. — 425 с.
2. Бохман Я.В. Лекции по онкогинекологии. — М.: МИА, 2007. — 304 с.
 3. Важенин А.В., Жаров А.В., Шимоткина И.Г. Актуальные вопросы клинической онкогинекологии М.: СТРОМ, 2010. — 128 с.
 4. Винокуров В.Л. Рак яичников: закономерности метастазирования и выбор адекватного лечения больных. — СПб.: Фолиант, 2004. — 333с.
 5. Генетика пухлин жіночих репродуктивних органів / За ред. В.М. Запорожана. — Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2004. — 332 с.
 6. Запорожан В. М., Цегельський М. Р., Рожковська Н. М. Акушерство і гінекологія. Підручник: У двох томах. — Одеса: Одес. Держ. Мед. ун-т, 2005. — 420 с.
 7. Клиническая онкогинекология / под ред. В.П. Козаченко. — М.: Медицина, 2005. — 376с.: ил.
 8. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. — М.: Практическая медицина. — 2006. — 503с.
 9. Лекции по онкогинекологии / под редакцией М. И. Давыдова, В. В. Кузнецова, В. М. Нечушкиной. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 432 с.
 10. Онкология: национальное руководство / Под ред. В.И. Чиссова, М.И. Давыдова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1072 с.
 11. Урманчеева А. Ф., Тюляндина С. А., Моисеенко В. М. Практическая онкогинекология: избранные лекции. — СПб.: «ТОММ», 2008. — 400 с.
 12. Химиотерапия злокачественных новообразований / Под ред. Э.Чу и В.Т. де Вита (перевод с англ.) — М.: Практика. — 2008. — 447с.
 13. Щепотин И.Б., Бондарь Г.В., Ганул В.Л. Алгоритмы современной онкологии. — Киев: Книга плюс, 2006. — 304 с.
 14. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol.* 2009; 3:97-137.
 15. 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.
 16. 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.
- ### References
1. Axel M.A, Barynov V.V, Bokyna L.I. Lectures in oncogynecology. — Moscow:-inform MEDpress, 2009. — 425 p.
 2. Bohman Y.V. Lectures in oncogynecology. — Moscow: MIA, 2007. — 304 p.
 3. Vazhenyn A. V., Zharov A.V., Shymotkyna I.G. Actual questions of clinical oncogynecology. M.: Strom, 2010. — 128 p.
 4. Vinokourov V.L. Ovarian cancerthe regularities of metastazing and choice of adequate treatment of patients. — St. Petersburg.: Folyant, 2004. — 333 p.
 5. Genetics of tumors of the female reproductive organs / Ed. by V.M. Zaporozhan. — Odessa: Odessa State Medical University Press, 2004. — 332 p.
 6. Zaporozhan V.M., Tsehelskyi M.R., N.M. Rozhkovska Obstetrics and Gynecology. Tutorial: In two volumes. — Odessa: Odessa State Medical University Press, 2005. — 420 p.
 7. Clinical oncogynecology / ed. by V.P. Kozachenko. — Moscow: Medicine, 2005. — 376 p.: ref.
 8. Korman D.B. Fundamentals of antineoplastic hymyoterapyy. — М.: Practical Medicine. — 2006. — 503 p.
 9. Lectures in oncogynecology / Ed. by M.I. Davydov, V.V. Kuznetsov, V.N. Nechushkyna. — Moscow: -inform MEDpress, 2009. — 432 p.
 10. Oncology: National manual / Ed. by V.I. Chyssov, M.I. Davydov. — Moscow: GOETAR-Media, 2008. — 1072 p.
 11. Urmancheeva A.F., Tyulyandyn S.A., Moyseenko V.M. Practical oncogynecology: selected lectures. — St. Petersburg. "ТОММ", 2008. — 400 p.
 12. Chemical therapy of malignant tumors / ed. by E. Chu and V.T. de Vit (s translation of the English.) — Moscow: Practice. — 2008. — 447 p.
 13. Schepoty I.B, Bondar G.V., Ganul V.L. Algorithms of modern oncology. — Kiev: Book Plus, 2006. — 304 p.
 14. Lynch H.T., Casey M.J., Snyder C.L. et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology and management // *Molecular Oncology.* — 2009; 3:97-137.
 15. 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. — Vol. 101. — P. 238-243.

16. Shulman L.P., Dungan J.S. Cancer genetics: risks and mechanisms of cancer in women with inherited susceptibility to epithelial ovarian cancer // *Cancer Treat. Res.* — 2010. — Vol. 156. — P. 69-85.

Резюме

АНАЛІЗ МУТАЦІЙ ГЕНІВ MLH1, MSH2 ТА CAS20Q13 У ПЛАТІНОРЕФРАКТЕРНИХ ХВОРИХ НА РАК ЯЄЧНИКІВ

*Дубініна В.Г., Рибін А.І.,
Лисенко М.А., Кузнецова О.В.*

У статті проведено порівняльний аналіз чутливості пацієнок з раком яєчників стадії IIIA-IIIC до ад'ювантної терапії препаратами платини в залежності від наявності або відсутності мутації генів MLH 1, MSH 2 і CAS 20q13. Обстежено 106 пацієнок з раком яєчників, які проходили лікування на базах кафедри онкології Одеського національного медичного університету. Визначення мутацій проводилося за допомогою методу «СНП-експрес». Авторами виявлена достовірна негативна кореляція між носительством мутації генів MLH 1, MSH 2 і CAS 20q13 і рефрактерністю злоякісних пухлин яєчників до хіміотерапії препаратами платини. Мутації зазначених генів зустрічалися достовірно частіше у пацієнок з чутливим до платини раком яєчників.

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

Summary

ANALYSIS OF MLH1, MSH2 AND CAS 20Q13 MUTATIONS IN PLATINUM REFRACTORY PATIENTS WITH THE OVARIAN CANCER

*Dubinina V.G., Rybin A.I.,
Lysenko M.A., Kuznetsova O.V.*

Despite the fact that ovarian cancer is among the most sensitive to the chemotherapy of tumors, and 30 % of patients with the disease are of primary resistant to platinum chemotherapy. Even if the optimal cytoreductive surgery and further

chemotherapy appointment platinum drugs (first-line chemotherapy) with the achievement of the effect of complete regression and normalization of tumor markers, 5 — year survival of patients with stage III ovarian cancer is 20-25 %, and stage IV — does not exceed 10 %. This means that, despite the absence of clinical signs of disease, the vast majority of patients in the first 2-3 years after first-line chemotherapy should be expected progression of the disease. The article provides a comparative analysis of the sensitivity of patients with ovarian cancer stage IIIA-IIIC 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». We identified a variety of options for gene mutations MLH 1 (14,2 %), MSH 2 (15.1 %) and CAS 20q13 (13,2 %) in patients with ovarian cancer. In the study groups showed no significant correlation between the stage of the disease, clinical and anamnestic characteristics of ovarian cancer patients and tumor sensitivity to platinum drugs. 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. According to our data, a hereditary predisposition to cancer of the ovaries affects the sensitivity or resistance of tumors to chemotherapy with platinum.

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

*Впервые поступила в редакцию 05.12.2013 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*