

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНА GST НА ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ РАКА ЯИЧНИКА

Проф. С. М. КАРТАШОВ, М. Н. ГАГУА

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Изучены наличие метилирования гена GST и содержание фактора некроза опухолей ФНО- α в сыворотке крови, а также морфологические свойства опухолей у больных раком яичников (РЯ) I–IV (T1C–3CN0–1M0–1) стадий. Установлено, что у больных с умеренно дифференцированными формами РЯ по количественным показателям пролиферативной активности новообразования можно прогнозировать длительность ремиссии. Метилирование гена GST достоверно чаще диагностируется у больных РЯ с худшим прогнозом течения заболевания.

Ключевые слова: рак яичников, ген GST, метилирование, морфология.

В начале третьего тысячелетия рак яичников (РЯ) остается одним из самых тяжелых онкологических заболеваний. Занимая по частоте встречаемости третье место среди онкогинекологической патологии, РЯ является одной из ведущих причин смертности у онкогинекологических больных [1]. По данным Международного агентства по изучению рака, ежегодно в мире регистрируется около 166 000 новых случаев рака яичников и около 101 000 женщин погибают от прогрессирования заболевания. Это обуславливает неиссякаемый интерес отечественных и зарубежных исследователей к проблеме онкогенеза РЯ [2]. Среди множества причин, влияющих на возникновение и течение РЯ немаловажную роль играют генетические факторы [3]. Установлено, что при РЯ накапливаются генетические повреждения, которые лежат в основе канцерогенеза. Причем часто встречаются обратимые трансформации активности генов, не связанные с нарушением структуры ДНК, но приводящие к изменению их функции (эпигенетические). К таким изменениям относятся и метилирование гена GST [4]. Метилирование ДНК препятствует взаимодействию регуляторных белков с промотором, а также способствует привлечению к району промотора белков, подавляющих транскрипции.

Корректный системный подход для повышения эффективности лечения больных РЯ возможен только при дальнейшем исследовании многих факторов, задействованных в патогенезе заболевания [5]. Поэтому перспективным представляется изучение генетических факторов в сочетании с дифференцировкой опухоли, ее пролиферативной особенностью, показателями апоптоза, уровнем цитокинов в крови, в частности фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) [6]. Исследование гена GST при РЯ актуально еще и с той точки зрения, что данный ген играет важную роль в метаболизме и эффективности цитостатиков, активно участвующих в лечении карцином яичников [7–9].

Цель исследования — изучить связь между метилированием гена GST, морфологическими свойствами опухолей и длительностью ремиссии больных РЯ.

Обследовано 184 больных РЯ I–IV (T1C–3CN0–1M0–1) стадий в возрасте от 32 до 79 лет; средний возраст — $56,8 \pm 2,2$ года. Больные были разделены на две группы: 1-ю группу составила 81 больная (44%) с ремиссией заболевания более 24 мес; 2-ю — 103 больных (56%) с ранними рецидивами. Исследуемые показатели анализировались с учетом степени дифференцировки опухоли.

Было проведено комбинированное лечение. Хирургическое лечение больных заключалось в экстирпации (179 больных — 96,3%) или ампутации матки (5 больных — 2,7%) с придатками и резекцией (15 больных — 8,2%) или экстирпацией (169 больных — 91,8%) большого сальника. Объем операции определялся в каждом конкретном случае общим состоянием больной и распространенностью процесса. Всем больным назначали полихимиотерапии на основе препаратов платины по схеме CAP (цисплатин + циклофосфамид + доксорубин — 26 больных), CP (цисплатин + циклофосфамид — 120 больных) и TP (паклитаксел + цисплатин — 38 больных).

Во всех случаях для верификации диагноза операционный материал подвергали морфологическому исследованию. Согласно классической гистологической методике обработки тканей применяли фиксацию в 10%-ном растворе формалина и парафиновую проводку. Гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также использовали метод Ван Гизон. Под микроскопом определяли тип опухоли, гистологическую структуру, степень дифференцировки, подсчитывали митотический индекс и количество патологических митозов по И. А. Алову. С использованием флуоресцентного микроскопа подсчитывалось количество клеток с характерной для апоптоза морфологией. Результат выражался в процентном соотношении клеток, т. е. показатель

апоптотического индекса (АИ) соответствовал количеству клеток, находящихся в состоянии апоптоза из 100 исследованных клеток. ФНО- α определяли иммуноферментным методом в сыворотке крови.

У всех больных методом полимеразноцепной реакции было изучено наличие метилирования гена GST в сыворотке крови. После выделения ДНК из сыворотки крови определяли метилирование промоторной области гена, для чего ДНК обрабатывали метилчувствительными рестриктазами. Поиск сайтов рестрикции осуществлялся с помощью программы «WIN-SUN». Исследования проводили в лаборатории «Вирола» ХМАПО.

Анализ данных показал, что высокодифференцированные (ВД) формы РЯ имеют относительно невысокую митотическую активность опухолевых клеток (1,32%). Количество патологических митозов составляет почти $\frac{1}{4}$ часть (24,7%) от всех митозов. При микроскопическом исследовании выявлено, что сами клетки и их ядра не отличаются значительным полиморфизмом, многие ядра имеют относительно четкие контуры, часть ядер расположена эксцентрично, при этом наблюдается достаточно высокий АИ (1,32%).

При сопоставлении показателей длительности ремиссии (таблица), характеризующих пролиферативные свойства ВД опухолей, выявлена четкая тенденция к увеличению митотического индекса до 1,47% (с 1,20%) и возрастанию количества патологических митозов до 27,7% (с 19,7%) у больных РЯ с меньшей ремиссией. По мере уменьшения длительности ремиссии и увеличения пролиферативной активности опухолей отмечалось снижение АИ в опухоли и содержания ФНО- α в крови. Метилирование гена GST чаще ($p > 0,05$)

встречалось у больных с меньшей длительностью ремиссии (27,3% в сравнении с 15,6%).

Пролиферативная активность умеренно дифференцированных (УД) опухолей по показателям митотического индекса (3,14%, $p < 0,01$) и количества патологических митозов (39,7%, $p < 0,01$) достоверно возросла в сравнении с высоко дифференцированными (ВД) новообразованиями. При увеличении степени злокачественности опухолевые клетки становятся более полиморфными, часто с крупными гиперхромными ядрами и ядрышками неправильной формы, иногда выявляются уродливые гигантские многоядерные опухолевые клетки.

В УД опухолях АИ и содержание ФНО- α в крови имели лишь слабо выраженную тенденцию к снижению при уменьшении у больных РЯ длительности ремиссии. При сравнении показателей, характеризующих пролиферативные свойства УД опухолей, с длительностью ремиссии отмечен достоверный рост митотического индекса ($p < 0,01$) и количества патологических митозов ($p < 0,05$) у больных РЯ с меньшей ремиссией. У больных с УД опухолями, имеющими разный прогноз течения заболевания, частота эпигенетических нарушений гена GST имела достоверную корреляцию: метилирование исследуемого гена чаще встречалось у больных РЯ с меньшей длительностью ремиссии (17,8% в сравнении с 43,4%, $p < 0,005$).

В опухолях, имеющих низкую степень дифференцировки (НД), нами отмечено еще большее возрастание величины митотического индекса ($p < 0,01$ по сравнению с его величиной при ВД и УД опухолях). Повышается количество патологических митозов в сравнении с их уровнем при ВД ($p < 0,05$) и УД ($p < 0,01$) опухолями. При этом АИ в опухоли и содержание ФНО- α в крови достоверно ниже в сравнении с показателями

Продолжительность ремиссии у больных РЯ I–IV стадий в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Группа обследованных больных	Показатель	Степень дифференцировки опухоли		
		ВД, $n = 54$	УД, $n = 74$	НД, $n = 56$
1-я, $n = 81$	Апоптотический индекс, %	1,41±0,17	1,21±0,12	1,11±0,18
	Фактор некроза опухоли, пкг/мл	21,3±2,26	22,9±2,40	24,8±3,01
	Митотический индекс, ‰	1,20±0,21	2,39±0,23	5,17±0,89**2,3
	Патологические митозы, %	19,7±3,09	34,7±3,16**2	42,3±6,44**3
	Частота метилирования гена GST, абс. ч./%	5/15,6±6,5 $n = 32$	5/17,8±7,3 $n = 28$	5/23,8±9,2 $n = 21$
2-я, $n = 103$	Апоптотический индекс, %	1,29±0,17	1,09±0,11	1,06±0,09
	Фактор некроза опухоли, пкг/мл	16,5±2,91	22,1±2,19*2	25,4±2,18*2
	Митотический индекс, ‰	1,47±0,24	3,75±0,33**1,2	5,29±0,48**2,3
	Патологические митозы, %	27,7±5,47	43,4±4,47*1**2	52,6±4,77**2
	Частота метилирования гена GST, абс. ч./%	6/27,3±9,5 $n = 22$	20/43,4±7,3*1 $n = 46$	18/51,4±8,4*1 $n = 35$

Примечание. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — достоверные изменения между группами; ¹ — сравнение с 1-й группой; ² — сравнение с ВД степенью; ³ — сравнение с УД степенью.

больных, имеющих опухоли с высокой степенью дифференцировки. НД опухоли отличаются резко выраженным клеточным и ядерным полиморфизмом, гетерохромией и высокой пролиферативной активностью, малым количеством или почти полным отсутствием стромы и сосудов. Происходит увеличение абсолютных и относительных размеров клеток и ядер, появляются обилие митозов (5,37%) и их патологические формы (50,7%) — многополюсные митозы, межхромосомные мосты, расщепление хромосом, К-митозы.

При сопоставлении количественных показателей пролиферативной активности НД опухолей с длительностью ремиссии достоверных различий не отмечено. В частности, митотический индекс был лишь слабо выражен, а количество патологических митозов имело четкую тенденцию к увеличению у больных РЯ с меньшей длительностью ремиссии. К особенностям их динамики следует отнести и тот факт, что АИ и содержание ФНО- α в крови практически не отличались у больных РЯ, имеющих разную длительность ремиссии. При этом следует отметить, что больные с НД формами РЯ как в группе с большей, так и с меньшей длительностью ремиссии имели аналогичные отличия по исследуемым показателям от больных с ВД и УД формами. У больных с НД новообразованиями нами отмечена следующая зависимость от прогноза течения заболевания: количество эпигенетических нарушений гена GST достоверно больше у больных РЯ с меньшей длительностью ремиссии (51,4% в сравнении с 23%, $p < 0,05$).

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что злокачественные эпителиальные опухоли яичников с разной степенью дифференцировки имели достоверные отличия по исследуемым морфологическим показателям пролиферативной активности опухолей. Однако эта зависимость характерна для большинства солидных новообразований. К специфическим особенностям следует отнести слабую корреляцию между АИ и степенью дифференцировки опухоли. Также нами не отмечено существенных отличий у больных с разной степенью дифференцировки новообразований и по уровню ФНО- α в крови.

Литература

1. Орлова Р. В. Современное стандартное лечение больных раком яичников // *Практ. онкология.*— 2000.— № 4.— С. 42–44.
2. Урманчеева А. Ф., Мешкова И. Е. Вопросы эпидемиологии и диагностики рака яичников // *Практ. онкология.*— 2000.— № 4.— С. 7–13.
3. Абелев Г. И., Конкин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) // *Биохимия.*— 2000.— Т. 65, № 1.— С. 3–5.
4. Залетаев Д. В., Немцова М. В., Бочков Н. П. Метилирование ДНК как этиологический фактор канцерогенеза // *Вестн. РАМН.*— 2002.— № 4.— С. 6–11.
5. Молекулярная генетика опухолей человека / Е. Н. Имянитов, В. П. Калиновский, П. Г. Князев и соавт. // *Вопр. онкологии.*— 1998.— Т. 43, № 1.— С. 95–101.
6. Бутенко З. А. Гены и опухолевый рост // *Лікування і діагностика.*— 1999.— № 1.— С. 6–8.
7. Coughlin S. S., Hall I. J. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer: A huge review // *Genetics in Medicine.*— 2002.— Vol. 4, № 4.— P. 250–257.
8. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype / A. Spurdle, P. Webb,

- D. Purdie et al. // Carcinogenesis.— 2001.— Vol. 22, № 1.— P. 67–72.
9. Promoter Hypermethylation Profile of Ovarian Epithelial Neoplasms / P. B. Makarla, M. H. Saboorian, R. Ashfaq et al. // Clin. Cancer Research.— 2005.— Vol. 11, № 15.— P. 5365–5369.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ МЕТИЛУВАННЯ ГЕНУ GST НА ПРОГНОЗ ПЕРЕБІГУ РАКУ ЯЄЧНИКА

С. М. КАРТАШОВ, М. Н. ГАГУА

Вивчено наявність метилування гену GST та вміст фактора некрозу пухлин ФНП- α у сироватці крові, а також морфологічні властивості пухлин у хворих на рак яєчників (РЯ) I–IV (T1C–3CN0–1M0–1) стадії. Встановлено, що у хворих з помірно диференційованими формами РЯ за кількісними показниками проліферативної активності новоутворення можна прогнозувати тривалість ремісії. Метилування гену GST достовірно частіше діагностується у хворих РЯ з гіршим прогнозом перебігу захворювання.

Ключові слова: рак яєчників, ген GST, метелування, морфологія.

INVESTIGATION OF INFLUENCE OF GST GENE METHYLATION ON THE PROGNOSIS OF OVARIAN CANCER COURSE

S. M. KARTASHOV, M. N. GAGUA

The presence of GST gene methylation and amount of tumor necrosis factor- α in the blood serum as well as morphological properties of tumors in patients with stage I–IV ovarian cancer (T1C–3CN0–1M0–1) were investigated. It was determined that in patients with moderately differentiated qualitative parameters of the tumor, proliferative activity can be used to predict the remission duration. GST gene methylation is more frequently diagnosed in patients with ovarian cancer with worse prognosis of the disease course.

Key words: ovarian cancer, GST gene, methylation, morphology.

Поступила 20.01.2011