

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ

В.А. Пушкарев, В.А. Кулавский, Т.В. Викторова, Г.М. Исхакова, Е.В. Кулавский

Кафедры акушерства и гинекологии и биологии Башкирского государственного медицинского университета, Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ Республики Башкортостан, Уфа

GENETIC ASPECTS OF ENDOMETRIAL CANCER

V.A. Pushkarev, V.A. Kulavsky, T.V. Viktorova, G.M. Iskhakova, E.V. Kulavsky

Department of Obstetrics and Gynecology and Department of Biology, Bashkir State Medical University, Republican Clinical Cancer Dispensary, Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa

Whether endometrial cancer (EC) is associated with different allele variants of genes of the detoxification system of xenobiotics has been studied and analyzed. The study has been conducted on a sufficient number of patients (102 and 149 women in the study and control groups, respectively). The methods used have been quite adequate to solve the set task.

There are significant differences in the distribution of the frequency of genomes of the GSTM1 gene between patients with EC and the controls ($\chi^2 = 3.9$, $p = 0.05$).

Homozygous carriers of GSTP1 gene mutation in EC patients are encountered more frequently in the control group (5.9 and 3.4%, respectively), which shows the increased probability of EC in women with this genotype; heterozygous carriers of mutation with Ile/Val genotype are also identified more frequently in EC patients (47.05 %) than those in the control group (33.5; $p = 0.04$); the odds ratio was 1.76, which suggests a high risk of EC.

Key words: endometrial cancer, detoxification of xenobiotics, mutations

В течение последних двух десятилетий в России, так же как и в большинстве стран мира, отмечается отчетливая тенденция к увеличению частоты гормонозависимых опухолей, в том числе рака эндометрия (РЭ). На протяжении последних 10 лет РЭ занимает 4-е место в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женского населения России, составляя 6,4—6,5%. Гиперпластические процессы эндометрия, предраковые состояния и РЭ наиболее часто встречаются у социально активной группы женщин — репродуктивного и перименопаузального возраста. В последние годы наибольший прирост заболеваемости зафиксирован среди молодых женщин. Так, в России стандартизованный показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями эндометрия за последние 10 лет возрос на 25,8 %, а среди женщин до 29 лет — на 50% [1, 2].

В настоящее время подтверждена концепция о существовании двух патогенетических вариантов РЭ: гормонозависимого и автономного.

Развитие молекулярной биологии, медицинской генетики, клинической иммунологии позволило выявить сложную систему факторов, участвующих в клеточной регуляции, и расширить существующие представления о межклеточном взаимодействии и внутриклеточных процессах, проходящих в гормонозависимых тканях [3, 4].

В формировании репродуктивного здоровья человека участвует множество факторов как эндо-

генного, так и экзогенного характера [5—7]. Среди эндогенных факторов важную роль в развитии нарушения репродукции играет генетическая предрасположенность. Гены детерминируют развитие всех белков и ферментов, вовлеченных в патогенез репродуктивной патологии. В их число входят гены, ответственные за метаболизм в организме ксенобиотиков, включая гормоны и лекарственные препараты [8—13].

Доказано, что у человека существует генетический контроль метаболизма поступающих в организм химических соединений (детоксикация ксенобиотиков), поэтому в зависимости от особенностей генома различные индивиды могут сохранять устойчивость либо, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к внешнесредовым агентам, что проявляется в увеличении заболеваемости и смертности [8, 11, 13]. В частности, согласно данным литературы, полиморфизмы генов цитохрома P-450, глутатион S-трансфераз обнаруживают ассоциацию с эндометриозом, раком яичников, груди и РЭ [14—16].

На основании того, что РЭ — многофакторное заболевание, и с учетом возможной роли генетических факторов в развитии данной патологии нами проведено изучение полиморфизма генов, прямо или опосредованно участвующих в патогенезе заболевания.

Молекулярно-генетический анализ проведен у 102 женщин с диагнозом РЭ, находившихся на лечении в РКОД Уфы в 2004—2006 гг. Воз-

раст больных на момент обследования варьировал от 31 года до 73 лет, в среднем составив $62,5 \pm 2,9$ года. В контрольную группу вошли 149 практически здоровых женщин. Все обследованные — жительницы Республики Башкортостан, сопоставимые по возрасту и этнической принадлежности.

Материалом для молекулярно-генетического исследования служили образцы ДНК. Кровь набирали в пробирки со стандартным консервантом (1 мл глюцира) в соотношении 4:1. До выделения ДНК кровь хранилась при температуре -4°C не более 1 мес. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороморфной экстракции. Подсушенный осадок ДНК растворяли в деионизированной воде. Раствор ДНК хранился при температуре -20°C .

Анализ полиморфных локусов генов детоксикации ксенобиотиков *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) синтеза ДНК на термоциклере в автоматическом режиме с использованием локус-специфических олигонуклеотидных праймеров (табл. 1).

Аmplифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 7% полиакриламидном неденатурированном геле (ПААГ). После окончания электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия в течение 10 мин и анализировали при ультрафиолетовом освещении на трансиллюминаторе.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критериев χ^2 и расчетом показателя отношения рисков (ОР).

Полиморфизм 7-го экзона гена *CYP1A1* обусловлен однонуклеотидной транзицией А-Г, приводящей к замене аминокислоты изолейцина (Ile) на валин (Val) в положении 462-го полипептида. В отсутствие полиморфного сайта рестрикции продукты амплификации имели размеры 48 и 139 пар нуклеотидов (пн), что соответствует «нормальному» аллелю

Pe. При наличии полиморфного сайта рестрикции фрагмент размером 139 пн делился на отрезки 120 и 19 пн, что соответствует полиморфному аллелю Val. При изучении полиморфизма гена *CYP1A1* установлено, что распределение частот генотипов у больных РЭ несколько отличалось от контрольной группы ($p > 0,05$). Выявлено, что у больных РЭ чаще, чем в группе контроля, встречались гетерозиготные носители мутации с генотипом Pe/Val (11,8 и 8,0% соответственно, ОР 1,52). Частота аллелей гена *CYP1A1* характеризовалась преобладанием мутантного аллеля Val у больных РЭ по сравнению с группой контроля (6,9 и 4,0% соответственно, ОР 1,76). Анализ частот генотипов полиморфного локуса гена *CYP1A1* в зависимости от морфологической структуры опухоли показал, что среди больных с редкими формами РЭ — железисто-плоскоклеточной, светлоклеточной мезонефридной, аденокантомой — значительно чаще встречались гетерозиготные носители мутации с генотипом Pe/Val (40,0, 40,0, 33,3% соответственно).

Методом ПЦР-анализа нами изучена частота гомозиготных носителей делеции гена глутатион S-трансферазы M1 (*GSTM1*), сопровождающейся полным отсутствием белкового продукта и формирующей нулевой генотип-*GSTM1* 0/0. Наличие гомо- и гетерозигот по нормальному аллелю — генотип *GSTM1**(+) определялось присутствием на электрофореграммах фрагмента амплификации размером 271 пн. Отсутствие данного фрагмента указывало на гомозиготное состояние по делеции данного участка гена (генотип *GSTM1**(0)). Результаты, полученные при сравнительном изучении распределения частот генотипов гена *GSTM1* у больных РЭ и в контрольной группе, представлены в табл. 2. Установлено наличие существенных различий по распределению частот генотипов гена *GSTM1* между больными РЭ и контрольной группой ($\chi^2=3,9$; $p=0,05$). Так, среди пациенток с РЭ женщины с делецией гена *GSTM1* встречались чаще, чем среди здоровых, с частотой 49,0% против 36,9% в контрольной группе.

Таблица 1. Тип полиморфизма, последовательности праймеров и ферменты рестрикции

Наименование локуса	Последовательность олигонуклеотидных праймеров	Способ анализа	Номенклатура аллелей (размер ДНК-фрагментов, пн)
CYP1A1 A4889G	5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3', 5'-GAAAGACCTCCCAGCGGTCA-3'	ПЦР, ПДРФ/HincII	A (48,139), G (48,120,19)
GSTM1 Del	5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3', 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	ПЦР	+ (271), 0/0 (нет)
GSTP1 A313G	5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3', 5'-TGAGGGCACAGAAGCCCCT-3'	ПЦР, ПДРФ/BstMAI	A (176), G (91,85)

Таблица 2. Распределение частот генотипов полиморфных локусов генов *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1* у больных РЭ и в контрольной группе

Локус гена	Генотипы	Больные РЭ (n=102)		Группа контроля (n=149)		ОР	χ^2	p
		абс.	%	абс.	%			
<i>CYP1A1</i>	Ile/Ile	89	87,3	137	92,0	0,60	1,01	0,32
	Ile/Val	12	11,8	12	8,0	1,52	0,58	0,45
	Val/Val	1	0,98	0	0	0	0,045	0,85
	Ile	190	93,1	286	96,0	0,57	1,45	0,23
	Val	14	6,9	12	4,0	1,76	1,45	0,23
<i>GSTM1</i>	normal «+»	52	51,0	94	63,1	0,61	3,9	0,05
	deletion «-»	50	49,0	55	36,9	1,64	3,9	0,05
<i>GSTP1</i>	Ile/Ile	48	47,05	94	63,1	0,52	5,70	0,02
	Ile/Val	48	47,05	50	33,6	1,76	4,09	0,04
	Val/Val	6	5,9	5	3,4	1,80	0,42	0,52
	Ile	144	70,6	238	79,9	0,61	5,23	0,02
	Val	60	29,4	60	20,1	1,65	5,23	0,02

У больных РЭ, имеющих в анамнезе бесплодие, носители делеции присутствовали в 41,7% случаев. Среди пациенток с редкими морфологическими формами РЭ имела тенденция к преобладанию гомозиготной делеции *GSTM1** (0) с частотой 80% при мезонефридной светлоклеточной карциноме, 100% — при аденоакантоме и недифференцированном раке, 63,6% — при железисто-сосочковой опухоли.

Генетический полиморфизм 5-го экзона гена *GSTP1* обусловлен транзицией аденина на гуанин в 5-м экзоне, что приводит к замене аминокислоты Ile на Val в 105-м положении белковой молекулы. При отсутствии полиморфного сайта рестрикции продукты амплификации имели размеры 176 пн, что соответствует «нормальному» аллелю Ile. В случае наличия полиморфного сайта рестрикции фрагмент размером 176 пн делился на отрезки 91 и 85 пн, что соответствует полиморфному аллелю Val. Показано, что при наличии мутантных форм активность фермента значительно снижена, что сопровождается нарушением процесса детоксикации ксенобиотиков. Данные, полученные при изучении распределения частот генотипов гена *GSTP1* у больных РЭ и в контрольной группе, представлены в табл. 2. Установлено, что у больных РЭ гомозиготный по мутации генотип (Val/Val) встречался чаще — 5,9%, чем в группе контроля, — 3,4% ($\chi^2=0,42$; $p=0,52$). Соответственно показатель ОР составил 1,8, что указывает на увеличение вероятности развития РЭ у женщин с данным генотипом. Гетерозиготные носители мутации с генотипом Ile/Val также чаще встречались среди больных (47,05%), чем в контрольной группе (33,5%). Показатель ОР равнялся 1,76, что свидетельствует о высоком риске развития РЭ. У больных с редко встречающимися морфологическими формами РЭ (мезонефридной светлоклеточной опухолью, недифференцированным раком, низкодиффе-

ренцированной аденокарциномой) чаще определяются носители гетерозиготного по мутации генотипа *GSTP1** Ile/Val (60,0, 100,0, 60,0% соответственно). Гомозиготный по мутации генотип *GSTP1** Val/Val с высокой частотой обнаружен у больных с высоко- и умереннодифференцированной аденокарциномой (57,1, 28,6% соответственно) и железисто-плоскоклеточным раком (14,3%).

На основе молекулярно-генетического изучения полиморфизма генов детоксикации ксенобиотиков у больных РЭ и в контрольной группе можно сделать следующие выводы.

1. Распределение частот генотипов гена *CYP1A1* показало, что у больных РЭ не чаще, чем в контрольной группе, встречаются гетерозиготные носители мутации с генотипом Ile/Val. Частота аллелей гена *CYP1A1* характеризовалась преобладанием мутантного аллеля Val у больных РЭ по сравнению с группой контроля (ОР 1,76).

2. Имеются существенные различия по распределению частот генотипов гена *GSTM1* между больными РЭ и контрольной группой ($\chi^2=3,9$; $p=0,05$).

3. Гомозиготные носители мутации гена *GSTP1* у больных РЭ встречаются чаще, чем в группе контроля (5,9 и 3,4% соответственно), ОР составил 1,8, что указывает на увеличение вероятности развития РЭ у женщин с данным генотипом; гетерозиготные носители мутации с генотипом Ile/Val также чаще присутствовали у больных РЭ (47,05%), чем в группе контроля (33,5%, $p=0,04$), ОР равнялся 1,76, что свидетельствует о высоком риске развития РЭ.

Исследованные нами гены *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1* кодируют ферменты, участвующие в системе биотрансформации ксенобиотиков. Увеличение частоты мутантных форм этих генов у женщин с РЭ подтверждает значимость их как генетических предикторов заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

- Кулаков В.И., Тохиян А.А. Проблемы злокачественных новообразований репродуктивной системы в практике гинеколога. Сборник научных трудов Пленума Межведомственного научного совета по акушерству и гинекологии РАМН. Ижевск, 2000.
- Чиссов В.И., Старинский В.В., Ременник Л.В. Злокачественные новообразования в Российской Федерации. М.: Медицина, 1997.
- Bao H., Verakomma M., Sarkar M. Benzo (a) pyren exposure induces CYP 1A1 activity and expression in human endometrial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81:37—45.
- Rebeck T.R., Troxel A.B., Wang Y. Estrogen sulfation genes, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk. *J Nat Cancer Inst* 2006;98:1311—20.
- Адамян Л.В., Спицын В.А., Андреева Е.Н. Генетические аспекты гинекологических заболеваний. М.: Медицина, 1999.
- Айламазян Э.К. Основные проблемы и прикладное значение экологической репродуктологии. *Журн акуш и жен бол* 2005;54:7—13.
- Сивочалова О.В. Риск нарушений репродуктивного здоровья женщин при воздействии вредных факторов. *Журн акуш и жен бол* 2005;54:42—51.
- Акуленко Л.В. О наследственном раке молочной железы, яичников и эндометрия (клиническая лекция). *Пробл репрод* 2004;10:20—7.
- Анисимов В.Н. Старение и канцерогенез: роль генетических и канцерогенных факторов. *Вопр онкол* 2005;51:4—5.
- Берштейн Л.М. Гормональный дисбаланс и его ассоциация с генетическими и генотоксическими параметрами при раке эндометрия: в поисках клинического эквивалента двух типов гормонального канцерогенеза. *Вопр онкол* 2005;51:7.
- Бочков Н.П. Клиническая генетика. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002.
- Вихляева Е.М. Молекулярно-генетические детерминаторы опухолевого роста и обоснование современной стратегии ведения больных лейомиомой матки. *Вопр онкол* 2001;47:200—4.
- Новик А.А., Камилова Т.А., Цыган В.Н. Генетика в клинической медицине. СПб.: ВМедА, 2001.
- Шарафисламова Э.Ф., Викторова Т.В., Хуснутдинова Э.К. Полиморфизм генов глутатион S-трансфераз M1 и P1 у больных эндометриозом из Башкортостана. *Мед генет* 2003;2:136—40.
- Doherty J.A., Weiss N.S., Freeman R.J. Genetic factors in catechol estrogen metabolism in relation to the risk of endometrial cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2005;14(2):357—66.
- Park S., Kang D., Noh D. et al. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. *Breast Cancer Res and Treat* 2003;78(1):89—96.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

- Статьи, направляемые в журнал «Опухоли женской репродуктивной системы», должны быть представлены на дискете или CD-носителях (электронная версия) с распечаткой на бумаге (в 2 экз., через 1,5 интервала, шрифт — Times New Roman, 14 пунктов).
К статьям должны быть приложены резюме на русском и желательна на английском языках объемом не более 1/3 машинописной страницы.
- В выходных данных следует указать: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, название учреждения, город.
Необходимо также приложить рекомендацию руководителя учреждения.
В конце статьи обязательно следует дать контактные телефоны, адрес электронной почты и Ф.И.О. авторов для связи.
- Объем лекции и обзора не должен превышать 10—12 стр., оригинальной статьи — 8 стр. машинописного текста. Список литературы соответственно не должен превышать 20 и 40 источников.
- Если статья сопровождается рисунками и таблицами, ссылки на них в тексте обязательны.
- Все рисунки должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями.
На рисунке указываются: «верх» и «низ»; фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита — «а», «б» и т.д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, расшифровываются в подрисуночной подписи. Электронный вариант рисунков должен быть выполнен в формате TIFF, 300dpi. Векторные иллюстрации — в формате EPS Adobe Illustrator 7.0—10.0.
Рисунки в программе Word не принимаются.
- Все таблицы должны быть пронумерованы и иметь заголовки. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.
- Список литературы приводится в порядке цитирования. Для каждого источника необходимо указать: Ф.И.О. авторов (если авторов не более четырех, то перечислить все их фамилии. Если более четырех — следует указать фамилии и инициалы трех первых авторов, а вместо перечисления остальных ставится «и др.» или «et al.»). Также следует дать название книги или статьи, название журнала, год, том и номер выпуска (для книги — место издания, название издательства, год), страницы.
- Буквенные сокращения в тексте статьи допускаются только после полной расшифровки понятия.
- Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи.
- Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати бесплатно.