

С. М. Карташов, Е. М. Олешко

Особенности микросателлитной нестабильности в слизистой оболочке толстой кишки и сыворотке крови у больных раком эндометрияХарьковская медицинская академия последипломного образования,
Харьковский областной клинический онкологический центр**Ключевые слова:** рак эндометрия, микросателлитная нестабильность, рак толстой кишки, сыворотка крови.

Актуальным является изучение связи между клиническими, фенотипическими и молекулярными факторами риска рака эндометрия и рака толстой кишки. У 342 больных раком эндометрия I–IV стадий в возрасте 30–80 лет в ткани опухоли, сыворотке крови и слизистой оболочке толстой кишки методом полимеразной цепной реакции определяли микросателлитную нестабильность. Установлено, что без учета микросателлитной нестабильности фенотипа рака эндометрия этот генетический феномен достоверно чаще определяется в сыворотке крови (10,8% случаев), чем в слизистой оболочке толстой кишки (6,1% случаев). Аналогичная закономерность отмечена в случаях, когда опухоль имела фенотип МСН+ (частота микросателлитной нестабильности в слизистой толстой кишки составила 12,2%, а в сыворотке крови – 29,6%, $p < 0,01$). При фенотипе опухоли МСН- феномен чаще отмечали в слизистой кишки (3,1%), чем в сыворотке крови (1,3%). Частота микросателлитной нестабильности в ткани толстой кишки выше у больных раком эндометрия, имеющих характерные для гормонозависимых форм фенотипические признаки и факторы риска. Это свидетельствует о перспективности подобных исследований с целью улучшения диагностики рака эндометрия и рака толстой кишки и формирования групп риска на основании молекулярно-генетических критериев.

Особливості микросателітної нестабільності в слизовій оболонці товстої кишки та сироватці крові у хворих на рак ендометрію

С. М. Карташов, К. М. Олешко

Актуальним є вивчення зв'язку між клінічними, фенотиповими і молекулярними факторами ризику раку ендометрію і раку товстої кишки. У 342 хворих на рак ендометрію I–IV стадій віком 30–80 років у пухлинній тканині, сироватці крові та слизовій оболонці товстої кишки методом полімеразної ланцюгової реакції визначали микросателітну нестабільність. Встановили, що без урахування микросателітної нестабільності фенотипу раку ендометрію цей генетичний феномен вірогідно частіше визначається в сироватці крові (10,8% випадків), ніж у слизовій оболонці товстої кишки (6,1% випадків). Аналогічну закономірність виявили у випадках, коли пухлина мала фенотип МСН+ (частота микросателітної нестабільності у слизовій товстої кишки становила 12,2%, а в сироватці крові – 29,6%, $p < 0,01$). При фенотипі пухлини МСН- феномен частіше траплявся у слизовій кишки (3,1%), ніж у сироватці крові (1,3%). Частота микросателітної нестабільності у тканині товстої кишки була вищою у хворих на рак ендометрію, що мають характерні для гормонозалежних форм фенотипові ознаки і фактори ризику. Це свідчить про перспективність подібних досліджень щодо поліпшення діагностики раку ендометрію і раку товстої кишки та формування груп ризику на підставі молекулярно-генетичних критеріїв.

Ключові слова: рак ендометрію, микросателітна нестабільність, рак товстої кишки, сироватка крові.**Патологія.** – 2014. – №1 (30). – С. 59–62**Features of microsatellite instability in the mucosa of the colon and blood serum in patients with endometrial cancer**

S. M. Kartashov, E. M. Oleshko

Aims. To estimate the MSI frequency in colonic mucosal lining and blood serum in patients with endometrial cancer (EC).**Methods and results.** In 342 patients aged 30–80 with stage I–IV endometrial cancer occurrence of microsatellite instability (MSI) in tumour tissue and blood serum was researched by means of the polymerase chain reaction method. It was established that without regard to carcinoma phenotype MSI this genetic phenomenon is determined significantly more often in blood serum (10.8% of cases) than in colonic mucosal lining (6.1 % of cases). A similar pattern was observed in cases with tumour phenotype MSI+ (MSI frequency in colonic mucosal lining made 12.2%, whereas in blood serum – 29.6%, $p < 0.01$).**Conclusion.** In cases with tumour phenotype MSI- the genome microsatellite instability was observed more often in colonic mucosal lining (3.1%) than in blood serum (1.3%). MSI frequency in colon tissue was higher in EC patients with phenotypic characteristics and risk factors typical for hormone-dependent forms.**Key words:** endometrial cancer, microsatellite instability, colon cancer, blood serum.**Pathologia.** 2014; №1 (30): 59–62

Рост количества заболевших злокачественными новообразованиями в мире продолжает увеличиваться, что связано с ростом численности населения, его старением и изменением образа жизни. С конца прошлого века отмечается тенденция к росту гормонозависимых опухолей репродуктивной системы, в том числе и рака эндометрия (РЭ), являющегося одной из самых распространенных онкогинекологических патологий в Европе и Украине (11,7%) [1,2].

За последние годы достигнуты разительные успехи в молекулярной биологии рака. Изучено и охарактеризовано множество онкогенов и генов-супрессоров, активация и инактивация которых является необходимым событием в процессе канцерогенеза. Огромный интерес с точки зрения профилактики, особенностей клинического течения и прогноза РЭ представляет информация о специфичности генетических изменений, вызванных воздействием конкретных канцерогенных веществ.

На сегодня установлено, что одним из характерных геномных нарушений при РЭ является микросателлитная нестабильность (МСН) – следствие инактивации генов системы репарации неспаренных нуклеотидов (mismatch repair genes), в частности MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, EHO1 в результате герминальных мутаций [2–5]. Известно, что этот молекулярно-генетический феномен характерен и для некоторых форм рака толстой кишки (5–30%), а данные специализированной литературы указывают на общие патогенетические механизмы при карциноме эндометрия и раке толстой кишки [6]. Так, в случае развития МСН в опухоли эндометрия отмечают большую вероятность развития аналогичного генетического нарушения в других тканях, склонных к развитию этого геномного нарушения. Такой тканью является слизистая оболочка толстой кишки.

МСН может быть обнаружена не только в опухоли, но и в крови, что может представлять клинический интерес как для определения групп риска (рака эндометрия, рака толстой кишки и др.), так и, возможно, для ранней диагностики указанных злокачественных заболеваний [7].

Сегодня принято считать, что появление МСН отражает нарушение системы репарации ДНК в клетке и свидетельствует о высокой вероятности возникновения трансформирующих мутаций по всему геному, что увеличивает риск развития РЭ и рака толстой кишки. Однако связь между клиническими, фенотипическими, и молекулярными факторами риска РЭ и рака толстой кишки требует дальнейшего изучения.

Цель работы

Оценить частоту МСН в слизистой оболочке толстой кишки и сыворотке крови больных РЭ.

Материалы и методы исследования

У 342 больных РЭ I–IV стадий (табл. 1) в возрасте 30–80 лет в ткани опухоли, сыворотке крови и слизистой оболочке толстой кишки определяли МСН.

Таблица 1

Распределение больных раком эндометрия в зависимости от стадии

Стадия заболевания, FIGO / TNM	Количество больных, абс. / %
IA / T1aNO0	214/84,6
IB / T1bNO0	39/15,4
Всего I ст. / T1a–bNO0	253/74,0
Всего II ст. / T2NO0	45/13,2
Всего IIIA – IIIC2 ст. / T1a–3bNO–1M0	37/10,8
Всего IVA – IVB ст. / T1a–4NO–1M0–1	7/2,0
Всего	342/100

Образцы слизистой оболочки толстой кишки получали при колоноскопии до проведения хирургического вмешательства. В ряде случаев биопсию брали в связи с клинической необходимостью (в частности, больным с сопутствующей патологией толстой кишки показания к колоноскопии определял хирург-эндоскопист).

МСН определяли методом полимеразной цепной реакции с использованием праймеров для микросателлитной последовательности (BAT-25, BAT-26) [8]:

BAT-26: 5'-TGA CTA CTT' TGG ACT TCA GCC-3'
5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3',

и для BAT-25: 5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'
5'-TCT GCA TTT TAA STA TGG CTC-3'.

Для выделения геномной ДНК из сыворотки крови использовали набор для выделения ДНК НПО «Силекс М» (Россия), согласно инструкции производителя. ПЦР проводили по стандартной схеме при помощи программируемого термоциклера «Терцик-2» ООО «ДНК-Технология», Россия. Результаты ПЦР оценивали в 8% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия с концентрацией 1 мг/мл, в качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК плазмиды, гидролизованную ферментом Нра II. Исследования проводили в лаборатории «Вирола», Харьковская медицинская академия последипломного образования. Разрешение комиссии по вопросам этики и биоэтики (протокол №4 от 18.04.2013 г., Харьковская медицинская академия последипломного образования). Полученный в результате исследования цифровой материал обработан общепринятыми методами вариационной статистики с использованием критерия χ^2 .

Результаты и их обсуждение

При оценке частоты встречаемости МСН в ткани толстой кишки отмечено, что достоверно чаще встречается МСН- ткань толстой кишки (93,9%) по сравнению с МСН+ (6,1%), $p < 0,01$.

Анализ частоты наличия МСН при РЭ показал, что МСН достоверно чаще определяется в сыворотке крови (10,8% случаев), чем в ткани (слизистой) толстой кишки (6,1% случаев) (табл. 2). Аналогичную закономерность отметили и в случаях, когда опухоль имеет фенотип МСН+ (частота МСН в слизистой толстой кишки составила 12,2%, а в сыворотке крови – 29,6%, $p < 0,01$).

Таблица 2

Частота встречаемости МСН в ткани толстой кишки и сыворотке крови при раке эндометрия

Распределение случаев РЭ с учетом наличия МСН	МСН+ ткань толстой кишки, абс. / %	МСН+ сыворотка крови абс. / %
МСН+ РЭ, n=115	14 / 12,2±3,1**	34 / 29,6±4,3**
МСН- РЭ, n=227	7 / 3,1±1,2*	3 / 1,3±0,8*
Всего, n=342	21 / 6,1±1,3**	37 / 10,8±1,7**

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ различие статистически достоверно между группами с использованием критерия χ^2 .

При анализе показателей в случаях, когда фенотип опухоли был МСН-, обнаружена обратная зависимость, то есть чаще микросателлитную нестабильность генома отмечали в слизистой толстой кишки, чем в сыворотке крови ($p < 0,05$).

Полученные данные логично могут быть объяснены для сыворотки крови. В случаях диагностирования МСН+ в сыворотке должна быть опухоль, имеющая аналогичные нарушения генома. Для больных РЭ с фенотипом МСН+ эта опухоль – карцинома эндометрия.

Для больных РЭ с фенотипом МСН- источником анализируемых генетических нарушений является только слизистая толстой кишки, имеющая МСН генома. Вероятность наличия микросателлитной нестабильности генома в других органах при отсутствии

другой злокачественной опухоли, по данным специализированной литературы, незначительна [9]. Учитывая, что в нашем исследовании количество таких случаев невелико, МСН в сыворотке крови определяли редко (1,3%), а количество случаев с фенотипом РЭ МСН+ значительно больше, что позволило чаще отмечать эту патологию в сыворотке крови (29,6% случаев). Следует акцентировать, что и в слизистой оболочке толстой кишки МСН генома чаще определялась в тех случаях, когда аналогичное генетическое нарушение определяли в опухоли эндометрия (12,2% и 3,1% случаев, $p < 0,01$). Эта зависимость может быть объяснена особенностями генотипа конкретной больной. Так, в случае развития МСН в опухоли эндометрия есть большая вероятность развития аналогичного генетического нарушения в других тканях, склонных к развитию МСН. Такой тканью является слизистая толстой кишки.

Таблица 3
Частота МСН в слизистой оболочке толстой кишки при раке эндометрия в зависимости от факторов риска

Факторы	МСН+ ткань толстой кишки, абс. / %
Бесплодие I, n=72	14 / 19,5±4,7
Бесплодие II, n=54	5 / 9,3±4,0
Табакокурение, n=142	17 / 12,0±2,7
Повышенный индекс массы тела, n=201	13 / 6,5±1,7
Гипертоническая болезнь, n=186	15 / 8,1±2,0
Сахарный диабет, n=114	11 / 9,6±2,8

Провели анализ частоты МСН в ткани толстой кишки в зависимости от характерных для РЭ фенотипических признаков и факторов риска (табл. 3).

Установлено, что наиболее часто микросателлитные нарушения генома в слизистой оболочке толстой кишки обнаруживали у больных с первичным бесплодием и у курящих. При классической для РЭ триаде фенотипических признаков (гипертоническая болезнь, сахарный диабет, ожирение) МСН отмечали также часто, но они не были ведущими.

Полученные данные частоты нарушения МСН в ткани толстой кишки при РЭ в зависимости от факторов риска карциномы эндометрия показали наличие корреляции с большинством критериев, что подтверждает данные специализированной литературы о наличии общих патогенетических механизмов при РЭ и раке толстой кишки [10].

Выводы

1. МСН нарушения в слизистой оболочке толстой кишки и сыворотке крови чаще отмечают при МСН+ фенотипе РЭ.

2. На общность патогенеза РЭ и рака толстой кишки влияют схожие фенотипические признаки больных и развитие МСН.

Перспективы дальнейших исследований: улучшение диагностики РЭ и рака толстой кишки и формирование групп риска на основании молекулярно-генетических критериев.

Список литературы

1. Минимальные клинические рекомендации Европейского Общества Клинической Онкологии (ESMO) / [под ред. С.А. Тюлядина, Д.А. Носова, Н.И. Переводчиковой]. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. – 436 с.
2. Бюлетень Національного канцер-реєстру України / [З.П. Федоренко, Л.О. Гулак, Ю.Й. Михайлович та ін.] ; під ред. І.Б. Шепотіна. – К.: Національний інститут раку, 2013. – № 14. – 120 с.
3. Double strand break repair components are frequent targets of microsatellite instability in endometrial cancer / [C. Bilbao, R. Ramirez, G. Rodriguez et al.] // *European Journal of Cancer Prevention*. – 2010. – Vol. 46. – № 15. – P. 2821–2827.
4. Microsatellite Instability in Young Women with Endometrioid type Endometrial Cancer / [M.R. Abbaszadegan, H. Asadzadeh Aghdayi, F. Rastin et al.] // *Iranian Journal of Public Health*. – 2009. – Vol. 38. – № 3. – P. 24–30.
5. Relationship of lower uterine segment cancer with Lynch syndrome: a novel case with an hMLH1 germline mutation / [K. Masuda, K. Banno, A. Hirasawa et al.] // *Oncology Reports*. – 2012. – Vol. 28(5). – P. 1537–1543.
6. Федянин М.Ю. Роль микросателлитной нестабильности при раке толстой кишки / М.Ю. Федянин, А.А. Трякин, С.А. Тюлядин // *Онкологическая колопроктология*. – 2012. – № 3. – С. 19–25.
7. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients / [P. Anker, H. Mulcahy, X.Q. Chen et al.] // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 1999. – Vol. 18. – P. 65–73.
8. BAT-25 polymorphism in Chinese from Jiangsu province and its implication for locus microsatellite instability screening / [Y.Y. Zheng, L. Xie, L. Liu et al.] // *The International Journal of Biological Markers*. – 2012. – Vol. 27(3). – P. 227–231.
9. Кэрри Н. Эпигенетика: как современная биология переписывает наши представления о генетике, заболеваниях и наследственности: [пер. с англ.] / Н. Кэрри. – Ростов н/Д: Феникс, 2012. – 349 с.
10. Microsatellite instability (MSI) as genomic markers in endometrial cancer: toward scientific evidences / [A. Tinelli, V. Mezzolla, G. Leo et al.] // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2010. – № 10(14). – P. 1356–1365.

References

1. Tyulyadin, S. A., Nosov, D. A. & Perevodchikova, N. I. (Eds) (2010) *Minimalnye klinicheskie rekomendacii Yevropejskogo Obshhestva Onkologii (ESMO) [ESMO Minimum Clinical Recommendations]*. Moscow: Izdatelskaya gruppa RONC im. N.N. Blokhina RAMN. [in Russian].
2. Fedorenko, Z. P., Hulak, L. O., Mykhailovych, Y. U., et al. (2013) *Biuletyn Natsionalnoho kantser-reiestru Ukrainy [Bulletin of national cancer registry of Ukraine]*. I. B. Shchepotin (Ed). Kyiv: Natsionalnyi instytut raku. [in Ukrainian].
3. Bilbao, C., Ramirez, R., Rodriguez, G., Falcón, O., León, L., Diaz-Chico, N., et al. (2010). Double strand break repair components are frequent targets of microsatellite instability in endometrial cancer. *European Journal of Cancer*, 46(15), 2821–2827.
4. Abbaszadegan, M. R., Asadzadeh Aghdayi, H., Rastin, F., Dadkhah, E., Lotfalizadeh, M., Mohamadian Roshan, N., Farzadnia, M., et al. (2009) Microsatellite Instability in Young Women with Endometrioid type Endometrial Cancer. *Iranian Journal of Public Health*, 38(3), 24–30.

5. Masuda, K., Banno, K., Hirasawa, A., Yanokura, M., Tsuji, K., Kobayashi, Y., Kisu, I., et al. (2012) Relationship of lower uterine segment cancer with Lynch syndrome: a novel case with an hMLH1 germline mutation. *Oncology Reports*, 28(5), 1537–1543.
6. Fedyanin, M. Yu., Tryakin, A. A. & Tyulyadin, S. A. (2012) Rol' mikrosatellitnoj nestabil'nosti pri rake tolstoj kishki [The role of microsatellite instability in colon cancer]. *Onkologicheskaya koloproktologiya*, 3, 19–25.
7. Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X.Q. & Stroun, M. (1999) Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer and Metastasis Reviews*, 18, 65–73.
8. Zheng, Y. Y., Xie, L., Liu, L., Zhang, S. P., Wu, X. B., Zhu, C. L., Lai, R. S. (2012) BAT-25 polymorphism in Chinese from Jiangsu province and its implication for locus microsatellite instability screening. *The International Journal of Biological Markers*, 27(3), 227–231.
9. Carey, N. (2012) *E`pigenetika: kak sovremennaya biologiya perepisyvaet nashi predstavleniya o genetike, zabolevaniyakh i nasledstvennosti* [The Epigenetics Revolution: how modern Biology is Rewriting our Understanding of Genetics, Disease and Inheritance]. Rostov-na-Donu: Feniks. [in Russia].
10. Tinelli, A., Mezzolla, V., Leo, G., Pisano, M., Storelli, F., Alemanno, G., Malvasim, A. et al. (2010) Microsatellite instability (MSI) as genomic markers in endometrial cancer: toward scientific evidences. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(14), 1356–1365.

Сведения об авторах:

Карташов С.М., д. мед. н., профессор, зав. каф. онкогинекологии, Харьковская медицинская академия последипломного образования.

Олешко Е.М., к. мед. н., ассистент каф. онкогинекологии, Харьковская медицинская академия последипломного образования, E-mail: katerina_doc@ukr.net.

Надійшла в редакцію 14.04.2014 р.