

О.С. Дудніченко, Т.П. Якімова,
С.М. Карташов, В.Є. Кульшин

Харківська медична академія
післядипломної освіти

Харківський обласний
клінічний онкологічний
диспансер

Вплив гену p16 на розвиток раку яєчників

Influence of p16 gene on ovarian cancer development

Цель работы: Изучить роль гена p16 в развитии серозного рака яичников (РЯ).

Материалы и методы: Состояние гена p16 INK исследовали путем метилирования промоторной области гена в ткани яичников 54 женщин (22 рожавших, 18 – с трубным и 14 – с эндокринным бесплодием), 24 больных с цистаденомами и 18 – больных РЯ.

Результаты: Метилирование гена p16 выявлено в 5,6% случаев в яичниках женщин группы риска, в 12,5% – у больных с цистаденомами и 55,6% – с РЯ.

При проведении анализа связи между анамнестической наследственной предрасположенностью к раку и состоянием гена p16 установлено, что у женщин группы риска и больных с цистаденомой яичников метилирование гена p16 чаще наблюдается при наличии наследственной предрасположенности к раку. В то же время у больных РЯ выявлена обратная тенденция – ген p16 несколько чаще ингибирован при спорадической форме заболевания.

Оценивая возрастные закономерности метилирования гена p16 у женщин группы риска, больных с цистаденомами и с РЯ, без учета роли наследственной предрасположенности к раку, выявлено, что ингибирование исследуемого гена чаще имеет место у женщин более старшего возраста.

Выводы: Метилирование гена-супрессора клеточного цикла p16 наблюдается у абсолютного большинства больных РЯ, что доказывает его значение в развитии данного заболевания. Частота метилирования гена p16 увеличивается с возрастом. Ингибирование функции гена p16 – патогенетический фактор в развитии РЯ как у женщин с наследственной предрасположенностью к заболеванию, так и при спорадических формах рака.

Ключевые слова: яичник, цистаденома яичника, рак яичника, ген p16.

Objective: To study the role of p16 gene in serous ovarian cancer (OC) development.

Material and Methods: The state of p16 INK gene was studied using methylation of the promoter region of the gene in the tissue of the ovaries of 54 women (of them 22 had given birth, 18 with tubular infertility, 14 with endocrine infertility), 24 patients with cystadenomas and 18 with OC.

Results: Methylation of p16 gene was revealed in 5.6% of cases in the ovaries of women from the risk group, in 12.5% of patients with cystadenomas and in 55.6% of patients with OC.

The analysis of the correlation between the family history of cancer and the state of p16 gene demonstrated that in women from the risk group and in patients with cystadenoma of ovaries, methylation of p16 gene is more frequent at family history of cancer, while in OC patients a reverse tendency was noted, p16 gene was more frequently inhibited in a sporadic disease.

The evaluation of the age dependence of p16 gene methylation in women from the risk group, patients with cystadenomas and OC without taking into consideration the family history of cancer demonstrated that inhibition of the investigated gene is more common in an old age.

Conclusion: Methylation of suppressor gene of cellular cycle (p16) is observed in the majority of OC patients which proves its significance in the development of the disease. The frequency of p16 methylation increases with the age. Inhibition of p16 gene is a pathogenetic factor of OC development both in women with family history of cancer and in sporadic cancer.

Key words: ovary, cystadenoma of the ovary, ovarian cancer, p16 gene.

Останнім часом розв'язання питань етіології, патогенезу й ранньої діагностики багато в чому пов'язують із медико-генетичними дослідженнями, спрямованими на вивчення ролі спадкової схильності до розвитку раку яєчників (РЯ), їх генетичної гетерогенності та виявлення середродичів осіб із потенційно високим ризиком захворіти на цю форму раку [1–4]. Внесок факторів зовнішнього середовища в розвиток РЯ становить 44%, а генетичних – 56% [5–8]. Все це підтверджує необхідність вивчення генетичних основ РЯ, які мають значення в розвитку як спадкових, так і спорадичних форм [1, 6, 8, 9].

Нині встановлено, що причиною злоякісної трансформації клітин є накопичення мутацій, локалізованих, зокрема, в онкогенах і генах-супресорах [2, 3, 10]. Останні відповідають за синтез білків, які здійснюють негативний контроль клітинного поділу (p16) чи індукцію

апоптозу (p53) [3, 8, 11]. На противагу онкогенам, функціонально значущі мутації в супресорних генах мають інактивуючий характер. Встановлено, що при РЯ накопичуються генетичні ушкодження, що лежать в основі прогресивної трансформації доброякісних і граничних пухлин у злоякісні [7, 12].

Існує значна кількість онкогенів і генів-супресорів, втягнутих у патогенез РЯ. Важливе місце при цьому відводять гену-супресору клітинного циклу p16, розташованому на 9-й хромосомі [2, 4, 13]. Дефекти гена виникають зазвичай на ранніх стадіях канцерогенезу, насамперед при делеції та в другу чергу – при гіперметилуванні промоторної зони гена [4, 11, 13]. Неактивний стан гена p16 може бути зумовлений особливою компактною структурою хроматину – метилуванням ДНК. Останнє перешкоджає взаємодії регуляторних білків із промотором, а також сприяє залучен-

ню до району промотору білків, що придушують транскрипцію [2, 3, 13].

Метилування генів-супресорів клітинного циклу, найважливішими з яких є p53 і p16, сприяє розвитку ракової пухлини [2, 5, 7, 12]. При цьому очікується такий перебіг процесу, що призводить до виникнення раку. Організм може бути гетерозиготним за мутацією генів-супресорів. Нормальний алель продовжує виконувати функції супресора. Однак гіперметилування цього алеля, що призводить до інактивації гена-супресора, цілковито позбавляє клітину супресорної дії схильності до злоякісної трансформації. При цьому спочатку виникають порушення клітинного циклу з наступною трансформацією клітин та розвитком раку. Такий розвиток подій характерний і для РЯ [2, 7, 12, 14]. Метою нашої роботи стало вивчення ролі гена p16 у розвитку серозного РЯ.

Методика дослідження

Ген p16 досліджували у тканині яєчників 54 жінок – 42, хворих на серозні цистоаденоми яєчників та 18 – на серозний РЯ. Стан гена досліджували шляхом метилування його промоторної ділянки. Після отримання ДНК із матеріалу [15] проводили полімеразну ланцюгову реакцію [16] із використанням термофільної ДНК-полімерази НВО «Ферментас» (м. Вільнюс) з наступною рестрикцією [16]. Дослідження проводили в лабораторії «Вірола» (м. Харків).

Тканину яєчників досліджували у 22 жінок, які народжували, та 32 безплідних (18 – із трубним і 14 – ендокринним (склерокістоз яєчників) варіантами безпліддя).

До групи з обтяженим онкологічним анамнезом (ООА) було віднесено жінок, у яких родичі (1-й і 2-й ступені спорідненості) мали злоякісні новоутворення. В першу чергу враховували гормоноасоційовані новоутворення – яєчників, грудної залози, ендометрія, товстої кишки, у розвитку яких значна роль належить генетичним факторам [4, 14].

Результати та їх обговорення

Зважаючи на значну роль генетичних порушень, і зокрема, генів клітинного циклу в розвитку РЯ, ми вивчили стан гена p16 у нормальній тканині яєчників, цистоаденомах та РЯ. Ці дані оцінено з урахуванням спадкової схильності до раку (табл. 1).

Як видно з наведених у табл. 1 даних, метилування гена p16, тобто інгібування його функції, виявлено в 5,6% випадків. У решти жінок у тканині яєчника метилування гена

Таблиця 1 – Розподіл жінок у залежності від стану гена p16 у яєчниках, ДП і РЯ з урахуванням спадкової схильності до раку
Distribution of the women depending on the state of p16 gene in the ovaries, benign tumors and ovarian cancer with the account of family history of cancer

Досліджувані об'єкти	Спадкова схильність до раку	Метилування гена p16		Разом абс., %
		так абс., %	ні абс., %	
Яєчник	є	2 (11,6±7,9)	15 (88,4±7,9)	17 (100,0)
	немає	(2,7±2,5)	36 (97,3±2,5)	37 (100,0)
	разом	3 (5,6±3,1)	52 (94,4±3,1)	54 (100,0)
Цистоаденома яєчників	є	2 (25,0±15,3)	6 (75,0±15,3)	8 (100,0)
	немає	1 (6,3±5,9)	15 (93,7±5,9)	16 (100,0)
	разом	3 (12,5±6,6)	21 (77,5±6,6)	24 (100,0)
Рак яєчників	є	4 *1 (50,0±17,7)	4 (50,0±17,7)	8 (100,0)
	немає	6 **1 (60,0±15,5)	4 (40,0±15,5)	10 (100,0)
	разом	10 **1,2 (55,6±11,7)	8 (44,4±11,7)	18 (100,0)

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – відмінність між групами статистично вірогідна.

p16 не виявлено, тобто ген був функціонально активним.

Аналізуючи стан гена p16 з урахуванням спадкової схильності до раку, ми виявили певні особливості в досліджуваних групах. Так, у 11,6% жінок з ООА мало місце метилування гена p16, а у хворих без спадкової схильності до раку – тільки в 2,7%.

Оцінюючи стан гена-супресора p16 при доброякісних пухлинах (ДП) яєчників, ми виявили незначні порушення. Так, метилування гена p16 у ДП виявлено в 12,5% пацієнток. В абсолютній більшості хворих у тканині цистоаденому функціональна активність гена p16 не була інгібована.

При оцінці стану даного гена у хворих із ДП яєчників з урахуванням спадкової схильності до раку були виявлені певні тенденції й більш часте інгібування гена-супресора порівняно з таким у жінок, позбавлених ООА. Однак незначна кількість порушень гена p16 не дозволяє говорити про чіткі тенденції чи закономірності на підставі отриманих даних.

Аналіз стану гена p16 при РЯ виявив зміни, що принципово відрізняють дану групу хворих від інших досліджуваних груп жінок. Так, метилювання гена p16 при РЯ мало місце в 55, 6% випадків, тобто в абсолютної більшості хворих даного контингенту спостерігається інгібування функції гена-супресора p16. При оцінці стану останнього у хворих на РЯ з урахуванням спадкової схильності до раку принципових відмінностей між досліджуваними групами не виявлено, хоч і відзначено певні тенденції. Так, у більшості осіб зі спадковою схильністю до раку метилювання гена p16 спостерігається децю рідше, ніж у хворих, позбавлених ООА. Крім того, при схильності до раку в однакової кількості хворих функція гена p16 була інгібована і ген-супресор функціонував. У пацієнок без ООА метилювання гена мало місце в абсолютної більшості хворих і тільки у 40% з них ген був функціонально активним.

Зважаючи на дані літератури про збільшення частоти генетичних порушень із віком [11, 13], нами вивчено функцію гена p16 у жінок групи ризику, хворих на ДП і РЯ з урахуванням віку і спадкової схильності до раку (табл. 2).

Як видно з наведених даних, середній вік жінок у досліджуваних групах істотно відрізняється, що не дозволяє порівняти абсолютні показники. В той же час у кожній групі виявлено певні тенденції, пов'язані з віком, спадковою схильністю станом гена p16. Так, у групі ризику інгібування цього гена виявлено в жінок, старших за віком на 15 років. Ця залежність відзначається в обох групах хворих. Але якщо в жінок із ООА метилювання гена порівняно з жінками із нормально функціонуючим геном p16 виявлено лише на 5 років більше середнього віку, то відмінність у віці з нормальною й порушеною функцією гена-супресора в жінок без ООА склала 33 роки.

Таким чином, інгібування гена p16 у яєчниках жінок, які належать до групи ризику за розвитком РЯ, спостерігається частіше в пацієнок старшого віку. В той же час метилювання гена p16 у жінок із ООА розвивається в більш ранньому віці. Це може бути пов'язане з тим, що генотип жінок із спадковою схильністю до раку чутливіший до канцерогенних факторів [5, 6, 10], що й призводить до

Таблиця 2 – Вік обстежуваних жінок і хворих із цистаденомами й РЯ в залежності від стану гена p16 і спадкової схильності до раку
The age of the investigated women and patients with cystadenoma and ovarian cancer depending on the state of p16 gene and family history of cancer

Досліджувані об'єкти	Спадкова схильність до раку	Вік хворих, р.		
		метилювання гена p16		разом
		так	ні	
Яєчник	є	40,5±8,6	35,8±4,3	36,3±3,9
	немає	64,2±10,8	31,5±2,2	32,4±2,4
	разом	48,4±7,9	33,4±2,3	34,2±2,0
Цистаденома яєчників	є	38,8±7,2	35,5±4,7	36,3±4,5
	немає	47,3±7,4	40,8±4,2	41,2±4,3
	разом	41,7±7,3	39,3±3,8	40,4±3,9
Рак яєчників	є	41,9±5,3	48,7±5,7	45,3±4,9
	немає	62,4±6,9	47,3±5,6	56,3±6,3
	разом	54,2±6,2	47,9±5,4	51,4±5,8

більш раннього порушення, зокрема, метилювання гена p16 у молодшому віці.

Оцінюючи стан гена p16 у хворих із ДП і ООА, ми виявили, що вік жінок із інгібованим досліджуваним геном практично не відрізняється від віку осіб із нормально функціонуючим геном. Водночас середній вік жінок із метильованим геном p16, але позбавлених ООА, перевищував на 7 років вік жінок із нормально функціонуючим геном.

Таким чином, у хворих із ДП яєчників метилювання гена p16 мало, хоч і незначно виражену, вікову залежність тільки в осіб, позбавлених спадкової схильності до раку. Причому метилювання гена у них спостерігається частіше, так же, як і в жінок групи ризику у більш старшому віці.

При аналізі стану гена p16 при РЯ виявлено, що досліджуваний ген-супресор інгібується у хворих старшого віку. Так, середній вік хворих на РЯ з метильованим геном p16 на 7 років перевищує такий у жінок із нормально функціонуючим геном.

Оцінюючи середній вік жінок у залежності від спадкової схильності до раку й стану гена p16, ми виявили певні особливості. Якщо вік хворих на РЯ з ООА й метильованим геном p16 на 7 років менший, ніж у групі хворих із нормально функціонуючим геном, то в пацієнок без ООА із метильованим геном p16 середній вік на 15 років вищий, ніж у осіб без інгібування цього гена.

Таким чином, дослідження гена-супресора p16, пререгулятором клітинного циклу, показало значну відмінність між досліджуваними групами жінок. Так, метилювання, тобто інгібування функції гена p16, було виявлено в 5,6% випадків у яєчниках жінок, які належать до групи ризику за розвитком РЯ, і в 12,5% випадків у хворих на ДП яєчників. У той же час при РЯ ген p16 був метильований у абсолютній більшості хворих, що принципово відрізняє дану групу не тільки від жінок групи ризику, а й хворих із цистоаденомами яєчників.

Оцінюючи зв'язок між анамнестичною спадковою схильністю до раку й станом гена p16, ми виявили ряд особливостей. Зокрема, у жінок групи ризику й хворих на ДП яєчників простежувалася тенденція до більш частого інгібування досліджуваного гена в жінок із спадковою схильністю до раку. У хворих на РЯ має місце протилежна тенденція – ген p16 де частіше інгібований у хворих без ООА, тобто за спорадичної форми захворювання.

Простежуючи вікові закономірності, пов'язані з інгібуванням гена p16 у жінок групи ризику й хворих на ДП і РЯ, ми виявили, що в усіх досліджуваних групах, без урахування ролі ООА, інгібування гена p16 частіше мало місце в старшому віці, тобто частота порушення функції досліджуваного гена з віком зростає.

У той же час при спадковій схильності до раку має місце інша вікова закономірність, пов'язана з метилюванням гена p16: при РЯ його інгібування відбувається в жінок молодшого віку. Це може, з одного боку, служити підтвердженням того, що метилювання гена прискорює розвиток спадкових форм РЯ (тому середній вік хворих даної групи виявився нижчим). З іншого боку, те, що вік жінок із групи ризику й хворих на ДП, у яких був ООА та інгібований ген p16, незначно менший від віку хворих на РЯ з ООА та метильованим p16, може бути непрямым підтвердженням існування високої ймовірності появи РЯ й малігнізації ДП, що також підтверджує роль p16 у розвитку РЯ.

Крім того, після метилювання гена p16 у яєчнику чи ДП розвиток РЯ чи малігнізація цистоаденоми настає протягом доволі швидкого часу.

1. Метилювання гена-супресора клітинного циклу p16 спостерігається в абсолютній більшості хворих на РЯ, що доводить його значення в розвитку даного захворювання.

2. Частота метилювання гена p16 збільшується з віком.

3. Інгібування функції гена p16 – патогенетичний фактор у розвитку РЯ як у жінок зі спадковою схильністю до раку, так і в його спорадичних формах.

Література

1. Зборовская И.Б., Ельчева И.А. Молекулярно-генетические исследования при раке яичников (онкогены и гены-супрессоры опухолевого роста) // Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников. – М.: Клевер принт, 2001. – С. 10–31.
2. Хансон К.П., Имянитов Е.Н. // *Практ. онкол.* – 2000. – № 4. – С. 1–6.
3. McCluskey L.L., Chen C., Delgadillo E. et al. // *Gynecol. Oncol.* – 1999. – № 72. – P. 87–92.
4. Wolf J.K., Kirn T.E., Fightmaster D. et al. // *Ibid.* – 1999. – № 73. – P. 27–34.
5. Гарькавцева Р.Ф., Любченко Л.Н., Казубская Т.П., Жордания К.И. Наследственные формы рака яичников: диагностика, генетическая гетерогенность, клинические особенности, медико-генетическое консультирование // *Современные экспериментальные и клинические подходы к диагностике и рациональному лечению рака яичников.* – М.: Клевер принт, 2001. – С. 39–46.
6. Arzimanoglou M., Lallas T., Osborne M. et al. // *Carcinogen.* – 1996. – № 17. – P. 1799.
7. Kanuma T., Nishida J., Gima T. et al. // *Mol. Carcinog.* – 1997. – № 18. – P. 134–141.
8. Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular cloning.* – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989.
9. Ozols R.F., Rubin S.C., Thomas G. et al. *Epithelial ovarian cancer* // Hoskins W.J., Perez C.A., Young R.C. eds. *Principles and practice of gynecologic oncology.* 2nd ed. – Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 1997. – P. 919–986.
10. McCluskey L., Dubeau L. // *Curr. Opin. in Oncol.* – 1997. – № 9. – P. 465–470.
11. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. – СПб.: Спец. лит-ра, 1997. – 286 с.
12. Зборовская И.Б. Молекулярно-биологические исследования онкогенов и генов-супрессоров в практике клинической онкологии // *Канцерогенез.* – М.: Научный мир, 2000. – С. 361–379.
13. Гвоздев В.А. // *Соровск. образоват. журн.* – 1999. – № 10. – С. 11–17.
14. Woods J.A., Davis J.M., Smith J.A., Nieman D.C. // *Med. Sci. Sports. Exerc.* – 1999. – Vol. 31, № 1. – P. 57–66.
15. Rousse M.F. // *Oncogen.* – 1999. – № 18. – P. 5311–5317.
16. Aunoble B., Sanches R., Didier E., Bignon Y. // *Int. J. Oncology.* – 2000. – Vol. 16, № 3. – P. 567–576.

Дата надходження: 17.01.2002.

Дата остаточного надходження: 25.02.2002.

Адреса для листування:

Карташов Сергій Михайлович,
вул. Гв.-широнінців, 61а, кв. 246, Харків, 61135, Україна