

УДК 618.11+618.14]-006.6-033.2:577.21

Yu. G. Payanidi, V. Yu. Selchuk, A. Yu. Asanov, K. I. Gordania, T. I. Zakharova

THE ROLE OF GENETIC MARKERS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ENDOMETRIOID OVARIAN CANCER AND CORPUS UTERUS CANCER

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

The multiple primary malignancies are not yet studied well enough at present. The female genital polyneoplasia is, probably, the most urgent problem in clinical oncology. The differential diagnosis of multiple primary malignancies is the most important question to solve. Sometimes, it is very difficult to differentiate metastasis from multiple primary malignancies. The complex diagnosis methods including clinical laboratory instrumental and genetic will account for final diagnosis of this type of cancer.

Key words: endometrioid adenocarcinoma, ovarian, corpus uterus, metastasis.

Ю. Г. Паяниди, В. Ю. Сельчук, А. Ю. Асанов, К. И. Жордания, Т. И. Захарова

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИНХРОННОГО ЭНДОМЕТРИОИДНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ И ТЕЛА МАТКИ

ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Первично-множественные опухоли относятся к одной из наименее изученных проблем в современной онкологии. Существенное место в их структуре занимают полинеоплазии органов женского генитального тракта. Особенно актуальна дифференциальная диагностика первично-множественных и метастатических опухолей. Сказать, в каких случаях имеется первичная множественность, а в каких — метастазы, порой бывает очень сложно. Окончательно диагноз может быть установлен только путем комплексного обследования больного с использованием различных диагностических методик: клинических, лабораторных, инструментальных, а в последние годы и молекулярно-генетических методов исследования.

Ключевые слова: эндометриоидная аденокарцинома, яичники, тело матки, метастаз.

ВВЕДЕНИЕ

За последнее десятилетие в онкологии возрос интерес к изучению проблем, связанных с феноменом первичной множественности опухолей. Это обусловлено, в первую очередь, повсеместным увеличением количества больных данным видом онкологической патологии. Не последнее место в проблематике занимает возможность постановки и решения академических проблем канцерогенеза с использованием моделей первично-множественных и метастатических злокачественных новообразований. Предметом оживленных обсуждений и дискуссий является вопрос о дифференциальной диагностике синхронных злокачественных опухолей тела матки и яичников. Вместе с тем по ре-

зультатам немногочисленных публикаций, в которых, как правило, приведены единичные клинические наблюдения, не представляется возможным сделать вывод, в каких случаях процесс следует трактовать как первично-множественный, а в каких — как метастатический. Не будет преувеличением сказать, что этот вопрос встает особенно остро при выборе соответствующей тактики лечения таких больных. Зачастую на практике большинство клиницистов склонны рассматривать синхронные злокачественные новообразования тела матки и яичников как метастатические, представляющие собой единый распространенный опухолевый процесс [1]. Между тем это не всегда бывает оправдано. Для выяснения некоторых аспектов проблемы нами было проведено комплексное исследование синхрон-

ных первично-множественных и метастатических злокачественных новообразований яичников и тела матки.

Цель исследования — оценка эффективности использования молекулярно-генетических технологий для анализа клонального происхождения множественных опухолей репродуктивной системы женского организма. Теоретическая основа работы — фундаментальное представление о моноклональной природе опухолей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения гистотипа и клинических особенностей синхронных опухолей были использованы данные 79 случаев, наблюдавшихся в клинике с 1990 по 2004 г. Показано, что большинство синхронных опухолей тела матки и яичников имеет строение эндометриоидной аденокарциномы. У 41 (52 %) больной морфологически был подтвержден диагноз рака тела матки с метастазами в яичниках, а в 38 (48 %) случаях после планового гистологического исследования был поставлен диагноз первично-множественного синхронного рака яичников и рака тела матки. Для проведения молекулярно-генетических исследований был получен материал от 8 женщин, у которых диагностирован синхронный эндометриоидный рак яичников и матки (эндометрия). На основании результатов клинико-патологического и гистологического исследований каждый случай был оценен либо как случай первичной опухоли с метастазированием, либо как синхронный первично-множественный рак. Образцы тканей были подвергнуты препаративной микродиссекции с выделением пораженной и интактной областей, из которых в последующем были выделены уникальные образцы ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, клиническое течение заболеваний в 2 группах больных (раком тела с метастазами в яичниках и синхронным первично-множественным раком тела матки и раком яичников) имеет ряд существенных статистически достоверных отличий. Метастазы в яичниках при раке тела матки чаще всего выявляются у более пожилых женщин в менопаузе. В большинстве случаев у них наблюдается местнораспространенный опухолевый процесс, при котором опухоль эндометрия, представленная аденокарциномой с плоскоклеточной метаплазией (36,5 %), имеет смешанную форму роста (51,2 %), занимает всю полость матки и переходит на цервикальный канал (53,7 %), ее размеры превышают 5 см (48,8 %), а глубина инвазии в миометрий составляет более 1 см (56,1 %).

У больных первично-множественным синхронным раком тела матки и раком яичников заболевания выявляются чаще в молодом возрасте при сохраненной менструальной функции (57,9 %). В этих случаях чаще всего наблюдается высокодифференцированная аденокарцинома тела матки (52,6 %) с экзофитной формой роста (71,1 %), ее размер редко достигает 5 см (10,5 %), глубина инвазии миометрия не превышает

0,5 см (78,95 %). Опухоль эндометрия в редких наблюдениях (10,5 %) переходила на цервикальный канал, причем при глубине инвазии не более 1 см.

Сравнительное сопоставление выживаемости при синхронном первично-множественном раке яичников и раке эндометрия и выживаемости больных раком тела матки с метастазами в яичниках показывает, что для 1-й группы больных характерно более благоприятное течение заболевания. У них реже развиваются рецидивы — в 12 (31,6 %) наблюдениях, а 5-летняя выживаемость достигает 66,2 % (рис. 1).

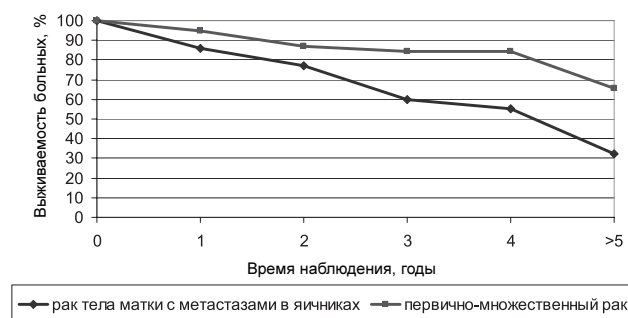


Рис. 1. Выживаемость 2 групп больных (первично-множественным синхронным раком яичников и раком эндометрия и раком тела матки с метастазами в яичниках)

Уровень общей 5-летней выживаемости больных раком тела матки с метастазами в яичниках составил 32,2 %. Срок, к которому погибло 50 % больных, — $39,3 \pm 3,2$ мес. Различия в группах сравнения статистически достоверны ($p < 0,05$).

На 2-м этапе работы были предприняты молекулярно-генетические подходы к дифференциальной диагностике синхронных полинеоплазий яичников и тела матки. Для этого были проведены исследования молекулярно-генетического разнообразия в опухолевых и нормальных тканях изучаемых органов путем анализа мутаций гена K-ras и феномена потери гетерозиготности (ЛОН-анализ).

Анализ мутаций гена K-ras. Одним из наиболее изученных онкогенов, активация которого часто обнаруживается при раке яичников, является ген K-ras. Продукт гена K-ras относится к классу G-белков и участвует в самых разнообразных аспектах регуляции клеточных процессов. Ранее было показано, что характер мутаций в гене K-ras зависит от гистологического типа и локализации опухоли. Так, мутации K-ras значительно чаще регистрируются при муцинозных по сравнению с немучинозным раком яичников, что позволяет обсуждать перспективность исследований мутаций гена K-ras для дифференциальной диагностики.

При рестрикции ПЦР продукта (157 п. н.) в случае отсутствия мутации имеется 2 сайта для эндонуклеазы, что приводит к образованию 3 фрагментов (114, 29 и 14 п. н.). При наличии мутации вследствие исчезновения одного из сайтов рестрикции образуются фраг-

менты 143 и 14 п. н. Схемы-интерпретации результатов анализа изменчивости гена K-ras представлены на рис. 2.

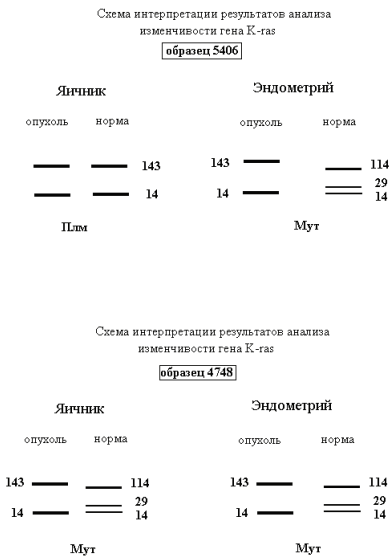


Рис. 2. Изменчивость гена K-ras: Мут — мутация; Плм — полиморфизм

Анализ потери гетерозиготности (LOH-анализ) был выполнен с использованием полиморфных микросателлитных маркеров для аллелей D3S4614 (3p21.31), D3S4604 (3p21.31–p21.2) гена RASSF1A и аллелей D17S578 (17p13) и D17S1353 (17p13) гена p53. Для LOH-анализа сравнивали интенсивность аллелей высокой (H-аллели) и низкой (L-аллели) молекулярной массы в соответствующих парах опухоль—норма. Случаи с уменьшением интенсивности одного из аллелей на 50 % и более рассматривали как LOH.

На следующем этапе работы была предпринята попытка выяснения, являются ли случаи множественных опухолей полинеоплазиями или же имеют метастатическое происхождение. Хорошо доказан факт, что каждая ткань характеризуется своим, как правило уникальным, набором микросателлитных локусов разной длины. Этот феномен был использован в настоящей работе для анализа происхождения опухолей. Если опухоли возникли независимо друг от друга, то картина расположения микросателлитных полос у них не будет соответствовать друг другу, если же 2-я опухоль — метастаз, то будет наблюдаться соответствие микросателлитов. В результате сопоставительного анализа аллельного дисбаланса в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов было сделано заключение о природе множественности поражения в каждом из 7 случаев. Логику заключения демонстрирует следующий пример (рис. 3).

Примером иллюстрации трактовки происхождения первично-множественности являются образцы опухолей яичника и эндометрия больной № 4748. Из рис. 3 ясно, что характеристики опухоли яичника и нормальной ткани яичника совпадают как по локусу

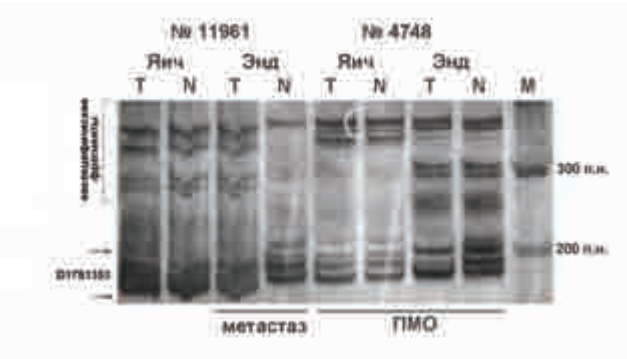


Рис. 3. Картина электрофоретического разделения продуктов ПЦР образцов тканей яичника и эндометрия больных № 11961 и № 4748 по локусу D17S1353

D17S1353, так и по набору («лестнице») неспецифических фрагментов. Вместе с тем особенности неспецифических фрагментов опухоли эндометрия и нормальной ткани эндометрия полностью совпадают, а «лестницы» опухоли эндометрия и яичника существенно различаются. Таким образом, опухоли яичника и эндометрия не совпадают по набору неспецифических фрагментов ДНК, но идентичны соответствующим норма, т. е. тканям, из которых они сформировались (табл. 1).

Таблица 1.

Результаты сопоставительного сравнения аллельного дисбаланса в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов и результаты гистологического исследования

Маркер		5406	8356	5641	11961	4748	5342	7253
RASSF1A	D3S4614	Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	Мет
	D3S4604	Мет	ПМО	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	Мет
p53	D17S578	Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	ПМО
	D17S1353	Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	Мет
Обобщенный результат		Мет	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО	Мет

Примечание: Мет — метастаз; ПМО — первично-множественные опухоли.

В целом сравнение полученных результатов с результатами гистологических исследований показало, что в 3 случаях отмечается полное или почти полное совпадение результатов молекулярно-генетического анализа 6 полиморфных локусов и заключения гистологов. В других 3 случаях выводы молекулярных и гистологических исследований не совпадали (см. табл. 1).

Для уточнения результатов молекулярно-генетического исследования несовпадающих случаев были предприняты дополнительные исследования 6 других полиморфных локусов гена RASSF1 (D3S2405, D3S2409, D3S3047, D3S2454, D3S2456 и D3S1766). Кроме того, в качестве контроля дополнительно иссле-

довано 2 случая с полным соответствием ранее полученных результатов (№ 4748 и 5342). Результаты дополнительных исследований приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2.

Результаты дополнительного исследования молекулярно-генетического разнообразия в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов

Маркер	Локализация	5406		5641		11961		4748		5342	
		Яич	Энд	Яич	Энд	Яич	Энд	Яич	Энд	Яич	Энд
D3S2405	3p25.3	ni	ni	Da	ni	ni	ni	D	ni	ni	ni
D3S3047	3p22.3	ni	ni	ni	O	D	ni	ni	ni	O	O
D3S2409	3p21.31	O	ni	O	ni	D	Da	MI	MI	O	O
D3S2456	3p21.31	D	MI	D	ni	ni	D	ni	D	O	O
D3S1766	3p21.1	MI	ni	O	O	D	D	Da	D	O	O
D3S2454	3p14.1	O	O	O	O	O	O	O	O	ni	O

Примечание: **Яич** — яичник; **Энд** — эндометрий; **O** — сохранение гетерозиготности; **D** — делеция; **Da** — делеция с амплификацией второго аллеля; **MI** — нестабильность микросателлитов как изменение длин маркера; **ni** — не информативный случай.

Таблица 3.

Результаты сопоставительного сравнения аллельного дисбаланса в опухолевых и нормальных тканях исследованных органов по дополнительным полиморфным локусам гена RASSF1

Маркер	Локализация	5406	5641	11961	4748	5342
D3S2405	3p25.3	Мет	Мет	Мет	ПМО	ПМО
D3S3047	3p22.3	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	ПМО
D3S2409	3p21.31	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	ПМО
D3S2456	3p21.31	Мет	ПМО	Мет	ПМО	ПМО
D3S1766	3p21.1	Мет	ПМО	Мет	ПМО	ПМО
D3S2454	3p14.1	Мет	ПМО	ПМО	ПМО	ПМО

Примечание: **Мет** — метастаз; **ПМО** — первично-множественные опухоли.

В целом результаты проведенного исследования позволяют заключить, что природа возникновения опухолей, оцененная по результатам проведенных исследований, подтверждена в 3 случаях, но оставалась неопределенной для случая № 5641 (5Мет:5ПМО) и № 11961 (6Мет: 4ПМО).

Для большей определенности было проведено сопоставление результатов молекулярно-генетических исследований с клинико-морфологическими находками этих двух случаев.

Обе женщины обратились в РОНЦ с далеко зашедшим распространенным онкологическим процессом. Поскольку известно, что в поздних стадиях развития злокачественных опухолей могут обнаруживаться разнообразные и неспецифические мутационные изменения, использование молекулярных технологий для дифференциальной диагностики может быть ограничено при распространенности опухолевого процесса [2–5].

ВЫВОДЫ

Таким образом, результаты проведенного пилотного исследования позволяют говорить о том, что молекулярно-генетические подходы могут иметь большое значение в дифференциации первично-множественных опухолей и первичной опухоли с метастазированием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Т. Н., Сельчук В. Ю., Баталина Л. Д. Диагностика первично-множественных синхронных злокачественных новообразований женских половых органов // Акуш. гинекол. — 2001. — № 4. — С. 45–46.
2. Brieger J., Jacob R., Riazimand H. S. et al. Chromosomal aberrations in premalignant and malignant squamous epithelium // Cancer Genet. Cytogenet. — 2003. — Vol. 144(2). — P. 148–155.
3. Castro I. M., Connell P. P., Waggoner S. et al. Synchronous ovarian and endometrial malignancies // Am. J. Clin. Oncol. — 2000. — Vol. 23(5). — P. 521–525.
4. Fujii H., Matsumoto T., Yoshida M. et al. Genetics of synchronous uterine and ovarian endometrioid carcinoma: combined analyses of loss of heterozygosity, PTEN mutation, and microsatellite instability // Hum. Pathol. — 2002. — Vol. 33(4). — P. 421–428.
5. Herrinton L. J., Voigt L. F., Weiss N. S. et al. Risk factors for synchronous primary endometrial and ovarian cancers // Ann. Epidemiol. — 2001. — Vol. 11(8). — P. 529–533.

Поступила 08.02.06