

ИЗМЕНЕНИЕ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ШЕЙКИ МАТКИ С ЭНДОФИТНОЙ И ЭКЗОФИТНОЙ ФОРМАМИ РОСТА

Петрусенко Н.А.¹, Никитина В.П.¹, Спиридонова Д.А.¹, Кечерюкова М.М.¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, e-mail: petrusenko-natulya@mail.ru

Рак шейки матки является четвертой ведущей причиной смертности от рака среди женщин во всем мире. Общая пятилетняя выживаемость составляет 68%. Целью нашей работы стало изучение изменения относительной копииности генов, ответственных за рецепцию и метаболизм эстрогенов в тканях шейки матки при эндофитной и экзофитной формах роста опухоли. В исследование вошли 40 пациенток в возрасте 28-63 лет с диагнозом рак шейки матки с эндофитной (n=20) и экзофитной (n=20) формами роста. Критерием отбора больных являлся морфологически подтвержденный диагноз плоскоклеточного рака шейки матки T1b-2aN0M0, стадия I-II. Методом RT-qPCR проводили оценку относительной копииности 8 генетических локусов: *ESR1*, *ESR2*, *GPER1*, *STS*, *SULT1A1*, *SULT1E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*. В качестве референсных использовали генетические локусы *GAPDH*, *B2M*. Согласно полученным данным копииность генов *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1* статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличивалась в опухоли по сравнению с условно нормальной тканью в обеих группах пациенток. Амплификация гена *CYP1A1* показательно изменялась возраст-зависимо: у пациенток 20-55 лет с экзофитной формой роста опухоли и у пациенток 36-55 лет с эндофитной формой роста опухоли ($p < 0,05$). Таким образом, из 8 исследованных локусов выявлена достоверная амплификация генов *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1* в клетках плоскоклеточного рака шейки матки вне зависимости от характера роста опухоли, что дает возможность использования указанных локусов в качестве биомаркеров малигнизации.

Ключевые слова: относительная копииность генов (CNV), плоскоклеточный рак шейки матки, экзофитная и эндофитная форма роста, *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1*.

THE CHANGE IN THE COPY NUMBER OF GENES IN MALIGNANT CERVICAL TUMORS WITH ENDOPHYTIC AND EXOPHYTIC FORMS OF GROWTH

Petrusenko N.A.¹, Nikitina V.P.¹, Spiridonova D.A.¹, Kecheryukova M.M.¹

¹FGBU "Rostov Research Institute of Oncology" of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: petrusenko-natulya@mail.ru

Cervical cancer is the fourth leading cause of cancer death among women worldwide. The overall five-year survival rate is 68%. The aim of our work was to study the changes in the relative copy numbers of the genes responsible for the reception and metabolism of estrogens in the tissues of the cervix with endophytic and exophytic forms of tumor growth to search for predictive markers of malignancy. The study included 40 patients aged 28-63 years with a diagnosis of endophytic cervical cancer (n = 20) and exophytic (n = 20) growth forms. The criterion for the selection of patients was a morphologically confirmed diagnosis of squamous cell carcinoma of the cervix T1b-2aN0M0, stage I-II. The RT-qPCR method was used to assess the relative copy numbers of 8 genetic loci: *ESR1*, *ESR2*, *GPER1*, *STS*, *SULT1A1*, *SULT1E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*. Genetic loci *GAPDH*, *B2M* were used as reference. Statistically reliable ($p < 0.05$) results were obtained on changes in the copy number of the genes *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1* in tumor tissue compared with conditionally normal tissue in both groups of patients with cervical cancer. A significant increase ($p < 0.05$) in the copy number of the *CYP1A1* gene was observed in patients in the group of 20-55 years with an exophytic form of tumor growth and in the group of 36-55 years with an endophytic form of tumor growth. Based on our results, it is possible to suggest the use of the genes *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1* as biomarkers for the malignancy of cervical tissue.

Keywords: relative gene copy number (CNV), cervical cancer, squamous cell carcinoma, exophytic and endophytic growth form, *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1*.

Рак шейки матки является четвертой ведущей причиной смертности от рака среди женщин во всем мире. Каждый год в мире выявляют 530 000 новых случаев рака шейки матки, что составляет около 9% новых случаев злокачественных заболеваний,

диагностируемых у женщин ежегодно. Общая пятилетняя выживаемость составляет 68%. Тем не менее пятилетняя выживаемость у пациентов с отдаленными метастазами составляет лишь 16% [1]. Около 90% рака шейки матки - плоскоклеточный рак, 5-10% - аденокарцинома, а остальные – редкие гистологические типы. Отмечены разные тенденции роста опухоли, характерные для различных возрастных групп: у более молодых женщин чаще встречаются опухоли с экзофитной схемой роста (наружу), у пожилых пациенток рак шейки матки чаще распространяется внутри шейного канала (эндофитная схема роста) [2].

Вариация числа копий (copy number variation - CNV) является основной категорией генетической изменчивости человека. Для множества генов в нашем геноме изменение дозировки генов путем дупликации или делеции вызывает фенотипический эффект. Большинство CNV представляют собой нормальные изменения и являются функционально доброкачественными, в то время как другие, чувствительные к дозировке гены, могут давать преимущество, как правило, связанное с заболеванием, включая рак. Точное обнаружение CNVs важно как для биомедицины, так и для клинической диагностики [3; 4].

Целью нашей работы стало изучение изменения относительной копийности генов, ответственных за рецепцию и метаболизм эстрогенов в тканях шейки матки при эндофитной и экзофитной формах роста опухоли для поиска предиктивных маркеров малигнизации.

Материал и методы исследования

В исследование вошли 40 пациенток в возрасте 28-65 лет с диагнозом рак шейки матки с эндофитной (n=20) и экзофитной (n=20) формами роста, проходивших плановое лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России. Критерием отбора больных являлся морфологически подтвержденный диагноз плоскоклеточного рака шейки матки T1b-2aN0M0, стадия I-II. Все пациентки подписали информированное согласие на обработку персональных данных и передачу биологического материала и сведений, составляющих врачебную тайну.

Экстракцию ДНК из FFPE-блоков опухолевой и условно здоровой ткани проводили набором Thermo Scientific Gene JET Ffpe DNA Purification Kit согласно инструкции изготовителя. Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флюориметре Qubit 2.0® (Invitrogen, США) с использованием набора Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity (HS) AssayKit (Invitrogen, США).

Методом RT-qPCR проводили оценку относительной копийности 8 генетических локусов: *ESR1*, *ESR2*, *GPER1*, *STS*, *SULT1A1*, *SULT1E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*. Каждые 25 мкл ПЦР-смеси содержали 10 нг геномной ДНК, 0,2mM dNTP's, по 600 нМ прямого и обратного праймеров, 2,5 mM MgCl₂, ПЦР-буфер, 0,05 u/μl ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* («Синтол», Россия). В качестве красителя использовали EvaGreen (Biotium, США).

Аmplификацию каждой из проб осуществляли в трех повторностях с использованием термоциклера CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 95 °С 3 мин., и 40 циклов при 95 °С 10 с, 58 °С 30 с (чтение оптического сигнала FAM для красителя EvaGreen) и 72 °С 15 с. Первичные данные RT-qPCR анализировали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (ver. 2.1) [5-7].

В качестве референсных использовали генетические локусы *GAPDH*, *B2M*. Прямые и обратные праймеры для всех генетических локусов были разработаны нами с использованием базы NCBI GenBank, их последовательности представлены в таблице 1 [8].

Таблица 1

Панель праймеров для определения копийности генов

№	Ген	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
1	<i>GAPDH</i>	GCTGAACGGGAAGCTCACT	GCAGGTTTTTCTAGACGGCAG
2	<i>B2M</i>	TGCTGTCTCCATGTTTGAATCT	TCTCTGCTCCCCACCAAGT
3	<i>ESR1</i>	CTGGAGACATGAGAGCTGCC	GCATCCAACAAGGCACTGAC
4	<i>ESR2</i>	GGCAAGGCCAAGAGAAGTGG	CTCCAGGAGGGTGAGCACTA
5	<i>GPER1</i>	CTCTTCCCCATCGGCTTTGT	CGGGGATGGTCATCTTCTCG
6	<i>STS</i>	CCACCSTTTACATCACGGCT	GTGAAGACACTGCCCTCTCC
7	<i>SULT1A1</i>	GGACTTCGTGGTTCAGCACA	CCTCATGAAGGGGGAGATGC
8	<i>SULT1E1</i>	GAGGAGCTTGTGGACAGGATT	CCTTTCTCATGAAGGGCGACA
9	<i>CYP1A1</i>	CAACTGCTATCTCCTGGAGCC	GCTCCTTTGGATCTTTCTCTGTA
10	<i>CYP1A2</i>	CACTGTGATTGGCAGGGAGC	GGTGAAGGGCAAGAAGGAGG

Относительную копийность генетического локуса (RCQ) рассчитывали по формуле $2^{-\Delta Ct}$. Дозу исследованного локуса считали равной диплоидному набору (2n), если отношение $RCQ_{\text{опухоль/норма}} \sim 1$. Если отношение $RCQ_{\text{опухоль/норма}}$ было $> 1,5$ или $< 0,5$, дозу локуса считали увеличенной ($\geq 3n$) или уменьшенной ($\leq 1n$) соответственно [5]. Оценку достоверности различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни в программе Statistica v.10.

Результаты исследования и их обсуждение

Для всех проанализированных генетических локусов было отмечено изменение дозы генов в опухолевых клетках шейки матки относительно нормальных: *ESR1*, *ESR2*, *GPER1*, *STS*, *SULT1A1*, *SULT1E1*, *CYP1A1*, *CYP1A2* соответственно в 17,5, 20, 32,5, 27,5, 35, 20, 42,5 и 27,5% случаев. Преобладала тенденция увеличения копийности (рисунок 1). Статистически

достоверное изменение копийности ($p < 0,05$) выявлено для трех генетических локусов - *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1*.

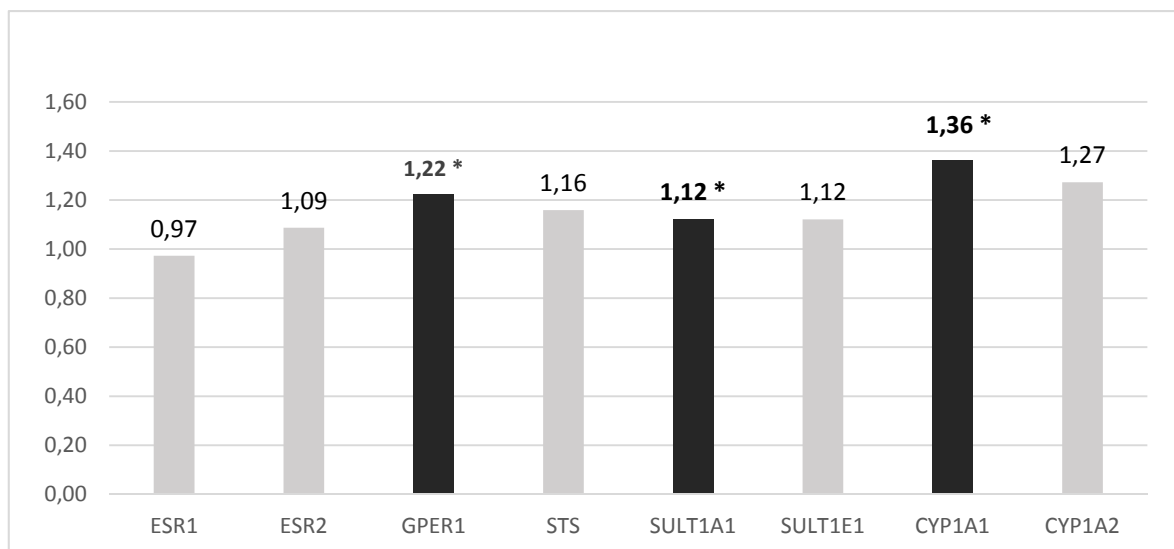


Рис. 1. Копийность генов в опухолевых тканях у пациентов с раком шейки матки относительно условно здоровых тканей. * - отмечены статистически достоверные различия от условно нормальной ткани ($p < 0,05$)

Значения отношения относительной копийности генов ($RCQ_{\text{опухоль/норма}}$) в группах с экзофитной и эндофитной формами роста опухоли представлены на рисунке 2.

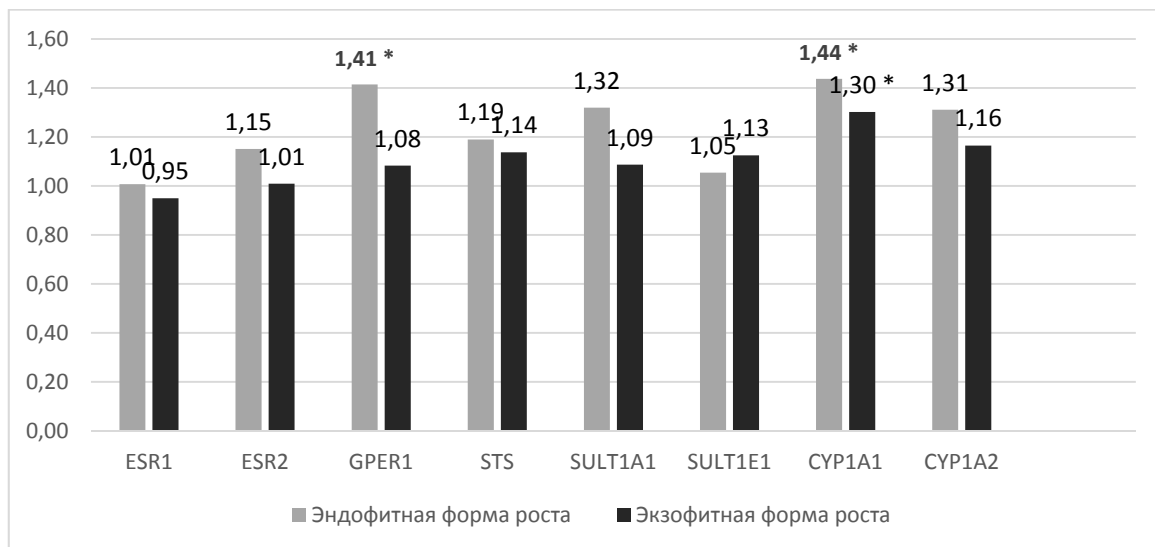


Рис. 2. Уровень $RCQ_{\text{опухоль/норма}}$ в группах с экзофитной и эндофитной формами роста опухоли у пациентов с раком шейки матки. * - отмечены статистически достоверные различия от условно нормальной ткани ($p < 0,05$)

После разделения общей выборки пациенток на две группы не изменилась общая тенденция увеличения копийности в ряду исследованных локусов (рисунок 2). Однако в

отличие от общей выборки увеличение дозы гена *SULT1A1* не достигает статистически достоверного уровня ни в одной группе ($p=0,242$ и $p=0,157$), а копияность локуса *GPER1* значимо повышается только в группе эндофитной формы роста ($p=0,040$). Кроме того, для группы с эндофитной формой роста было выявлено увеличение дозы гена *CYP1A2* ($p=0,253$). В целом при сравнении двух групп по уровню копияности исследованных локусов различий не выявлено.

Тем не менее анализ групп пациенток разных возрастов позволил идентифицировать различия. Отметим, что распределение пациенток по возрастам соответствовало нормальному (таблица 2) с преобладанием женщин в возрасте 36-55 лет.

Таблица 2

Возрастной состав пациенток с различными формами роста рака шейки матки

Возрастные интервалы	20-35 лет (%)	36-55 лет (%)	56-75 лет (%)
Экзофитная форма (n=20)	6 (30%)	11 (55%)	3 (15%)
Эндофитная форма (n=20)	4 (20%)	12 (60%)	4 (20%)

Данные по относительной копияности генов в разных возрастных группах при различных формах роста опухоли представлены в таблице 3.

Таблица 3

Изменение дозы генов в возрастных группах пациенток с раком шейки матки

Ген	Эндофитная форма роста			Экзофитная форма роста		
	20-35 лет	36-55 лет	56-75 лет	20-35 лет	36-55 лет	56-75 лет
<i>ESR1</i>	0,94	1,05	1,08	0,91	1,01	0,91
<i>ESR2</i>	1,11	1,07	2,20	0,97	1,07	0,81
<i>GPER1</i>	1,13	1,35*	3,10	1,35	1,08	0,78
<i>STS</i>	1,09	1,30	1,29	1,14	1,21	0,79
<i>SULT1A1</i>	0,98	1,18	2,82	1,03	1,32	0,95
<i>SULT1E1</i>	1,09	1,14	0,86	1,30	1,13	1,12
<i>CYP1A1</i>	1,18*	1,52*	1,00	1,26*	1,41*	0,91
<i>CYP1A2</i>	1,22	1,41	1,22	1,18	1,28	1,06

Примечание: * - статистически значимое отличие от условно нормальной ткани ($p<0,05$).

В группе пациенток 36-55 лет с эндофитной формой роста опухоли отмечено достоверное увеличение ($p<0,05$) копияности генов *GPER1* и *CYP1A1* с частотой 41,7% и

66,7% соответственно. Также в этой возрастной группе отмечалось увеличение амплификации гена *CYP1A2* у 41,67% пациенток. В возрастной группе 56-75 лет с эндофитной формой роста опухоли наблюдалось увеличение копий генов *ESR2*, *GPER1*, *SULT1A1* с частотой 50, 100 и 75% соответственно. В группе 20-35 лет с эндофитной формой роста опухоли изменения дозы генов не отмечено.

У пациенток с экзофитной формой роста опухоли в возрастной группе 20-35 и 36-55 лет выявлено достоверное увеличение ($p < 0,05$) копийности гена *CYP1A1* в 33,33% и 45,45% случаев соответственно. По остальным генетическим локусам в разных возрастных группах изменения копийности не наблюдалось.

Данные литературы подтверждают вовлеченность исследуемых генов в процессы онкотрансформации, которые связаны с функциями кодируемых белков.

Ген *GPER1* кодирует мембранный белок, который локализуется в эндоплазматической сети и является членом семейства рецепторов 1, ассоциированных с G-белком. Этот рецептор связывает эстроген и активирует многие нижестоящие сигнальные пути, что приводит к стимуляции аденилатциклазы и увеличению уровней циклического АМФ, а также способствует внутриклеточной мобилизации кальция и синтезу фосфатидилинозитол 3,4,5-трисфосфата в ядре. Следовательно, посредством этого белка реализуются клеточные и физиологические реакции на действие эстрогенов. Активация *GPER1* запускает множественные внутриклеточные каскады, связанные с пролиферацией, инвазией и миграцией. Локус *GPER1* в нашем исследовании продемонстрировал значимый уровень амплификации в эндофитной группе, что может обеспечивать механизм увеличения уровня рецептора *GPER1*, который широко экспрессируется во многих тканях по всему организму и часто высоко экспрессируется в линиях раковых клеток, особенно из агрессивных опухолей, и было показано, что он является важным прогностическим фактором при раке молочной железы, эндометрия, яичников. Высокая экспрессия *GPER1* в этих эстроген-ассоциированных опухолях была связана с метастазами и плохой выживаемостью [9].

Для гена *SULT1A1*, кодирующего одну из двух фенолсульфотрансфераз с активностью термостабильного фермента, нами была установлена тенденция к увеличению копийности в образцах рака шейки матки. Ферменты сульфотрансферазы (*SULT1A1*) катализируют сульфатную конъюгацию и участвуют в различных патофизиологических процессах, таких как метаболизм лекарств, рак, гормональная регуляция и биология нейротрансмиттеров. Цитозольная сульфотрансфераза 1A1 (*SULT1A1*) человека считается одной из наиболее важных изоформ *SULT* для метаболизма и детоксикации канцерогенов, стероидных гормонов (например, эстрогенов) и других распространенных лекарственных средств (например, тамоксифен). *SULT1A1* широко выражено в множественных тканях и действует

на широком диапазоне фенольных субстратов [10]. Описана роль генетического полиморфизма гена *SULT1A1*, связанного с повышенным риском рака легких, рака молочной железы, эндометрия и яичников, предстательной железы, мочевого пузыря и колоректального рака [11].

Наиболее часто в исследованной выборке изменялась степень амплификации гена *CYP1A1*, кодирующего фермент из суперсемейства цитохромов P450. Цитохромы P450 - это ферменты, которые отвечают за детоксикацию широкого спектра ксенобиотиков, включая лекарственные средства, загрязнители окружающей среды и канцерогенов, участвуют в биосинтезе холестерина, стероидов и других липидов. Подсемейство *CYP1A* (*CYP1A1* и *CYP1A2*) играет важную роль в метаболизме двух важных классов канцерогенов окружающей среды: полициклических ароматических углеводородов и акриламинов. Известно, что курение сигарет индуцирует *CYP1A1* и *CYP1A2*; высокий уровень этих ферментов CYP связан с повышенным риском рака легких и толстой кишки [12]. *CYP1A1* также участвует в метаболизме эстрогена. Следовательно, активность *CYP1A1* может влиять на канцерогенез шейки матки по крайней мере двумя различными путями: посредством метаболизма ксенобиотиков, в том числе табачного дыма, и эстрогенов эндогенного происхождения [13]. *CYP1A1* экспрессируется в опухолях молочной железы и играет роль в пролиферации, выживании и сигнальной трансдукции клеток рака молочной железы. Пути PI3K / АКТ и MEK / ERK являются критическими для прогрессирования рака молочной железы. Сайленсинг *CYP1A1* нарушает пролиферацию и выживание, в частности посредством активации фосфорилирования AMPK и снижения передачи сигналов АКТ, ERK и P70S6K [14]. Это означает, что *CYP1A1* не только участвует в метаболизме ксенобиотиков, но и играет важную роль в прогрессировании рака. В нашем исследовании амплификация гена *CYP1A1* с предполагаемым увеличением уровня фермента была показана у более молодых пациенток до 56 лет безотносительно принадлежности к группе по характеру роста опухоли.

Выводы

Получены статистически достоверные ($p < 0,05$) результаты по изменению копийности генов *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1* в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной тканью в обеих группах пациенток с раком шейки матки. У пациенток в группе 20-55 лет с экзофитной формой роста опухоли и в группе 36-55 лет с эндофитной формой роста опухоли отмечено достоверное увеличение ($p < 0,05$) копийности гена *CYP1A1*.

Таким образом, на основании полученных нами результатов можно предложить использование генов *GPER1*, *SULT1A1*, *CYP1A1* в качестве биомаркеров малигнизации тканей шейки матки.

Список литературы

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* 2015. Vol. 65. P. 5-29.
2. Mariano Volpacchio, Antonio Luna, Joan C. Vilanova. *Cervix and Vagina. Learning Genitourinary and Pelvic Imaging.* 2012. P.165-186. DOI: 10.1007/978-3-642-23532-0_8.
3. Rajini R. Haraksingh, Alexej Abyzov, Alexander Eckehart. Urban Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans *BMC Genomics.* 2017. Vol. 18. P. 321.
4. Alan M. Rice and Aoife McLysaght Dosage-sensitive genes in evolution and disease. *BMC Biol.* 2017. Vol. 15. P. 78.
5. Водолажский Д.И., Тимошкина Н.Н., Маслов А.А., Колесников Е.Н., Татимов М.З. Копийность 17-ти генетических локусов у пациентов с диагнозом аденокарцинома желудка // *Современные проблемы науки и образования.* 2017. № 3. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26405> (дата обращения: 01.06.2019).
6. Кутилин Д.С., Енин Я.С., Петрусенко Н.А., Водолажский Д.И. Изменение копийности генетических локусов при малигнизации тканей // *Современные проблемы науки и образования.* 2016. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25994> (дата обращения: 01.06.2019).
7. Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Kutilin D.S., Gudueva E.N. Changes in the number of copies of genetic loci in gastric cancer. *Mol. Biol.* 2015. Vol. 49. P. 589-597. DOI: 10.1134/S0026893315040093.
8. Кит О.И., Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Никитин И.С., Моисеенко Т.И., Франциянц Е.М. Изменение экспрессии эстроген-регуляторных генов при малигнизации тканей тела матки // *Кубанский научный медицинский вестник.* 2016. № 2 (157). С. 84-90.
9. Le Zhao, Xiao-Yun Zhu, Rong Jiang, Man Xu, Ni Wang, George G Chen, Zhi-Min Liu/ Role of GPER1, EGFR and CXCR1 in differentiating between malignant follicular thyroid carcinoma and benign follicular thyroid adenoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8(9). P. 11236-11247.
10. Jixia Liu, Ran Zhao, Zhan Ye, Alexander J. Frey, Emily R. Schriver, Nathaniel W. Snyder, and Scott J. Hebring. Relationship of Copy Number Variation with Estrogen Metabolism and Human Health. *J. Steroid Biochem Mol Biol.* 2017. Vol. 174. P. 169-175.
11. Jaclyn Daniels and Susan Kadlubar. Sulfotransferase genetic variation: from cancer risk to treatment response. *Drug. Metab. Rev.* 2013. Vol. 45 (4). P. 415-422.
12. Vidyullatha Peddireddy, Siva Prasad Badabagni, Sandhya Devi Gundimeda, Vasudha Mamidipudi, Pardhanandana Reddy Penagaluru, Hema Prasad Mundluru. Association of CYP1A1,

GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms with risk of non-small cell lung cancer in Andhra Pradesh region of South India. *Eur. J. Med. Res.* 2016. Vol. 21. P. 17.

13. Andrzej Roszak, Margarita Lianeri, Anna Sowińska, Pawel P. Jagodziński. CYP1A1 Ile462Val Polymorphism as a Risk Factor in Cervical Cancer Development in the Polish Population. *Mol. Diagn. Ther.* 2014. Vol. 18 (4). P. 445-450.

14. Mariangellys Rodriguez, David A. Potter. Cytochrome P450 1A1 Regulates Breast Cancer Cell Proliferation and Survival. *Mol. Cancer. Res.* 2013. Vol. 11(7). P. 780-792.