

В. Г. Дубініна, В. М. Боброва, В. В. Бубнов

## ФРАГІЛЬНІ ДІЛЯНКИ ХРОСОМ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ У ХВОРИХ НА РАК ЕНДОМЕТРІЯ

Одеський державний медичний університет,  
Науково-дослідний інститут реконструктивної і регенеративної медицини

Рак ендометрія є найбільш розповсюдженою злоякісною пухлиною жіночого генітального тракту. В індустріальних країнах частота зустрічальності раку ендометрія коливається від 10 до 25 захворюлих на 100 000 здорових жінок [1]. Рак ендометрія розділяють на два типи: естрогензалежний і естрогеннезалежний. Молекулярно-генетичні дослідження свідчать, що при розвитку естрогензалежного раку ендометрія найчастіше спостерігається мікросателітна нестабільність і мутації генів K-ras, PTEN, b-катенін, тимчасом як у патогенезі естрогеннезалежного раку ендометрія переважно беруть участь гени p53, p16, E-кадгерин [2]. Спадковими факторами схильності до розвитку естрогензалежного раку ендометрія є: синдром полікістозних яєчників, діабет, ожиріння, гіпертонія і т. ін. [1]. Крім спорадичних форм, відомі спадкові форми раку ендометрія: синдром Lynch (або спадковий неполіпозний рак прямої кишки) і синдром Muir-Torres [3]. У патогенез цих синдромів залучені гени міс-мач репарації ДНК (MSH2, MLH1, PMS1, MSH6, MLH3).

Фрагільні (ламкі) сайти являють собою ділянки ДНК із тандемно-повторюваними ди- або тринуклеотидними повторами, які формують незвичайні структури ДНК; такі експансії нуклеотидних повторів спостерігаються в регіонах експресованих генів і спричинюють динамічні мутації, метилування [4; 5]. Фрагільні сайти

включаються в сестринські хроматидні обміни, делеції і транслокації; у цих ділянках відбуваються ампліфікації генів й інтеграції плазмід [6]. Саме у ламких ділянках найчастіше відбувається розрив хроматиди з наступною перебудовою хромосоми. Загальні фрагільні сайти корелюють із хромосомними перебудовами в пухлинах. Специфічну ламкість хромосом у спектрі рідкісних сайтів часто виявляють у хворих зі спадковими формами раку.

Із вищевикладеного випливає, що в розвитку раку ендометрія велику роль відіграють генетичні фактори, тому уявляється важливим вивчення геномної нестабільності в хворих на рак ендометрія на рівні соматичних клітин (лімфоцитів периферичної крові). Одним із шляхів визначення спадкової схильності до онкозахворювань може бути пошук цитогенетичних маркерів у вигляді сайтів підвищеної ламкості хромосом у лімфоцитах периферичної крові. Завдання цього дослідження полягало у вивченні і визначенні локалізації фрагільних сайтів хромосом у лімфоцитах периферичної крові хворих на рак ендометрія.

### Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для досліджень служили лімфоцити периферичної крові 30 хворих на рак ендометрія. Хворих було обстежено до проведення терапії в гінекологічному відділенні

Одеського обласного онкологічного диспансеру.

Для культивування лімфоцитів периферичної крові використовували напівмікрометод [7] з модифікаціями, прийнятими у нашій лабораторії. Взяття крові проводилося стерильно на гепарині. В умовах стерильного боксу здійснювалася посадка клітин для подальшого культивування. На кожного хворого використовували 3–4 флакони. У кожен флакон додавали 5 мл середовища 199, 75–125 мкл фітогемаглютиніну (ФГА), 0,5 мл цільної гепаринізованої крові. Рідкісні фрагільні сайти є фолатчутливими і можуть бути виявлені на середовищі, збідненому фолатами. Середовище 199 не містить фолатів і фолієвої кислоти, що є важливим для виявлення фрагільних сайтів хромосом [8]. Лімфоцити культивували 72 год в термостаті при 37 °С. На 69-й годині культивування додавали колхіцин у концентрації 0,15 мкг/мл на 1,5 год (при 37 °С), після закінчення терміну інкубації культуру лімфоцитів переносили в центрифужні пробірки і центрифугували 5 хв при 1500 об/хв на центрифусі з горизонтальним ротором. Обережно відбирали надосадову рідину, клітинний осад добре струшували, домагаючись зникнення грудочок. Потім до суспензії клітин додавали гіпотонічний розчин (0,555%-й розчин KCl). Розчин хлористого калію повинний бути свіжовиготовленим і попередньо нагрітим у термостаті до 37 °С. Інкубація



клітин у гіпотонічному розчині проводилася в термостаті при 37 °С 15–20 хв. Після закінчення інкубації проби центрифугували 5 хв при 1500 об/хв, відбирали надосадову рідину, добре струшували осад і вливали 6–7 мл фіксатора. Фіксували оцтовим алкоголем (3:1), фіксатор готувався *ex tempore* і повинний був бути попередньо охолодженим до -20 °С. Фіксацію проводили 3–4 рази до отримання прозорої надосадової рідини. Тривалість фіксації була такою: 1-ша фіксація — 20 хв; 2-га фіксація — 90 хв; 3-тя–4-та фіксації — 20 хв. Інкубація проводилася в морозильній камері при -20 °С. Після кожного етапу фіксації проби центрифугували і потім обережно відбирали піпеткою надосадову рідину, клітинний осад струшували. Після останньої фіксації суспензію клітин наносили на предметні стекла. Для цього вміщували чисті предметні стекла в дистильовану воду і охолоджували в морозильній камері до утворення на поверхні води тонкого шару льоду. Суспензію клітин наносили пастерівською піпеткою на охолоджені мокрі предметні стекла з висоти 15–20 см. Препарати висушувалися на повітрі.

Забарвлення препаратів проводилося за методикою G-забарвлення. Використовували буфер Соренсена (рН 6,8), для цього готували два розчини: розчин А — 1/15 М розчин двозаміщеного фосфату натрію; розчин В — 1/15 М розчин однозаміщеного фосфату калію. Перед уживанням розчини А і В змішували у співвідношенні 1:1. Для забарвлення препаратів змішували 5 мл розчину А, 5 мл розчину В і 15 крапель барвника Романовського, тривалість забарвлення — 5 хв, після забарвлення препарати промивали в трьох змінах дистильованої води і висушували на повітрі.

Хромосомний аналіз проводили на системі каріотипуван-

ня MetaSystems (Німеччина) з використанням програми "Ikaros". Було проаналізовано не менше 20 метафазних пластинок для кожної пацієнтки.

### Результати дослідження та їх обговорення

У хворих на рак ендометрія спостерігалася фрагільність у 22 сайтах хромосом (рис. 1). Найбільшою частота зустрічальності фрагільних сайтів хромосом була в ділянках: 5q2.3-3.1 (5,33 %); 2q2.4-3.1 (9,33 %); 1q2.5-4.1 (4,2 %); 4q2.8-3.1 (4,0 %). Ламкість хромосом у ділянках 2p1.5-2.2 (2 %); Xq2.3-2.5 (1,8 %); 1p3.3-3.4 (1,33 %); 3q2.6 (2,2 %); 4q1.5 (2,4 %); 10q2.5 (1,25 %) була частою знахідкою. Також була виявлена ламкість у ділянках 1q1.1; 1p1.2; 5p1.4; 5q1.6; 6q2.6; 9q1.1; 10q1.1; 12q1.1; 13q3.2; 13q2.2; 18q1.1; 20q1.1 (рис. 1). Фрагільні сайти хромосом являють собою специфічні локуси, що є особливо чутливими, формуючи пропуски, розриви і перебудови хромосом. Цитогенетично фрагільний сайт виявляється як пропуск або неоднорідність у структурі хромосоми (рис. 2). Фрагільні сайти розділяють на

дві групи: рідкісні і загальні, залежно від їхньої індукції і частоти зустрічальності в популяції. Загальні фрагільні сайти виявляються у всіх індивідумів під впливом хімічних мутагенів. Ці сайти схиляють хромосоми до розривів і перебудов при розвитку раку [9]. Рідкісні фрагільні сайти виявляються менш ніж у 5 % індивідумів і мають сімейну сегрегацію. Більшість рідкісних фрагільних сайтів індукуються дефіцитом фолатів [6]. Доведено, що дефіцит фолатів сприяє розвитку як спорадичної, так і спадкової форм раку прямої кишки. Фолати є кофакторами для синтезу пуринів і піримідинів, дефіцит фолатів призводить до індукції гіпометилування геномної ДНК [10; 11]. Таким чином, дефіцит фолатів індукує розриви ДНК, погіршує репарацію ДНК і призводить до різних мутацій. Фрагільність експресується завдяки збільшенню кількості ди- і тринуклеотидних повторів і їхньому метилуванню, у метафазних хромосомах формуються складні структури із нуклеотидних повторів, які зупиняють синтез ДНК. Рідкісні фолатчутливі

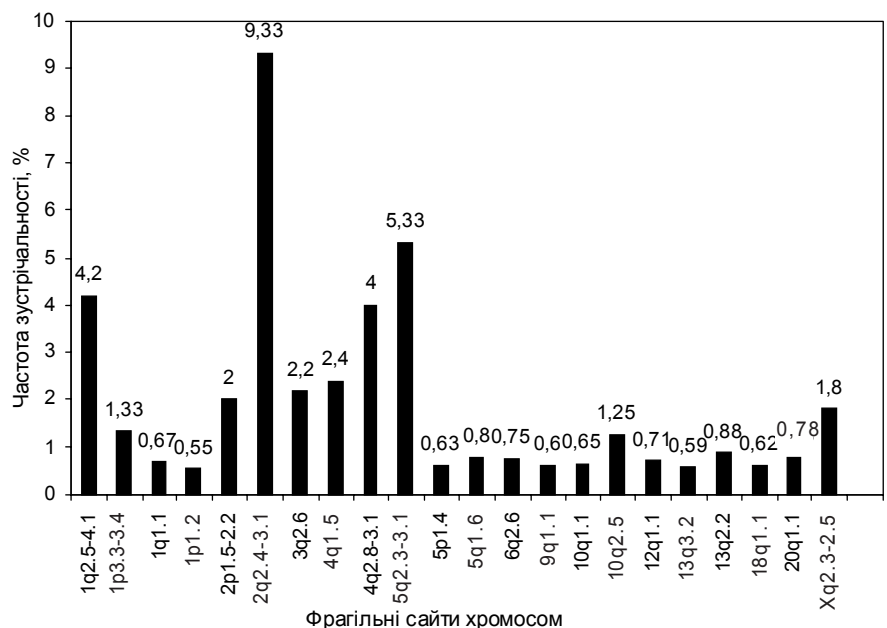


Рис. 1. Локалізація і частота зустрічальності фрагільних сайтів хромосом при дослідженні лімфоцитів периферичної крові жінок, хворих на рак ендометрія



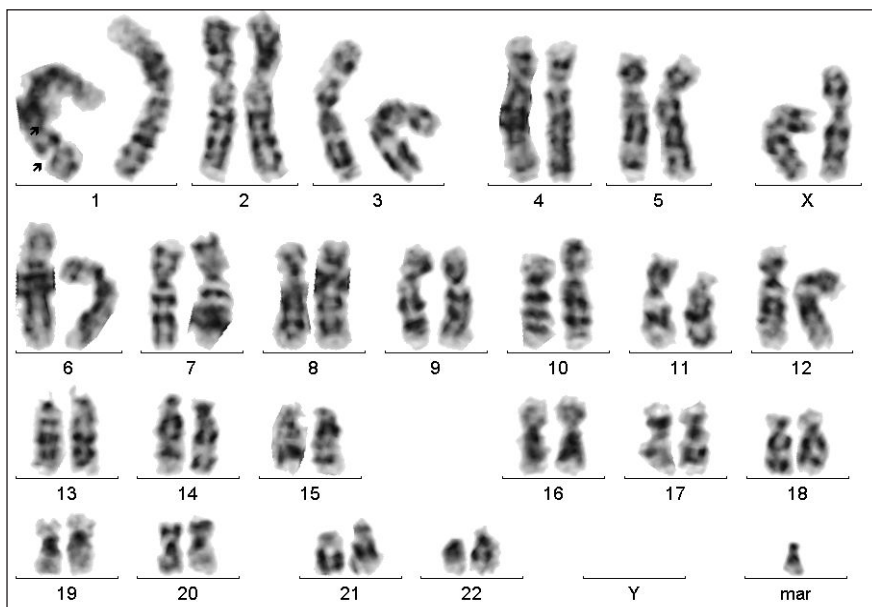


Рис. 2. Каріотип лімфоцитів периферичної крові хворої на рак ендометрія 47,XX, +mar; 11p-; FRA1q3.2; ламку ділянку хромосоми позначено стрілкою

фрагільні сайти асоційовані з транскрипційно-мовчазними генами, деякі загальні фрагільні сайти можуть також зачіпати експресований ген через виникнення регіону хромосомної нестабільності [12]. У таблиці наведено усі фрагільні сайти, що зустрілися в наших хворих; більшість фрагільних сайтів збігається із вже відомими сайтами фрагільності, практично усі виявлені фрагільні сайти є загальними, тільки один сайт (18q1.1) рідкісний. Три фрагільних сайти (1p1.2, 12q1.1 і 18q1.1) не збігаються з жодним із відомих фрагільних сайтів. Незважаючи на те, що фрагільні сайти в пацієнок з раком ендометрія виявлялися на середовищі, збідненому фолатами, в основному проявилися загальні фрагільні сайти. Це може бути пов'язане з тим, що на пізніх стадіях розвитку раку пухлиною продукуються речовини, що індують загальні фрагільні сайти. Як відомо, загальні фрагільні сайти індуються інгібіторами нуклеотидного обміну [12; 13].

Багато які з ламких сайтів, виявлених нами, збігаються або локалізовані поблизу онкогенів і протоонкогенів, що

беруть участь у виникненні, прогресії раку ендометрія або є такими, що схиляють до його появи. Мутації в генах репарації PMS1, MSH6/GTBP, MSH2, COCA, LCFS2, NF1 виявляються при спадкових формах раку ендометрія (синдроми Tuir-Morre, Lynch, нейрофіброматоз 1). Саме в регіонах розташування цих генів і були виявлені фрагільні сайти хромосом у хворих на рак ендометрія (таблиця). У розвитку естрогензалежної форми раку ендометрія беруть участь гени PTEN, CYP1B1, CYP17, ER1, ER2 COX-1, COX2 та ін. Розташування фрагільних сайтів у хворих на рак ендометрія також збігалось з хромосомним розташуванням цих генів. У патогенезі естрогензалежного раку ендометрія велику роль відіграють фактори ризику: ожиріння, синдром полікістозних яєчників, діабет, гіпертонія [14]. Як виявилось, хромосомна локалізація деяких із відомих генів, відповідальних за ці захворювання, збігається з локалізацією фрагільних сайтів у обстежених нами хворих на рак ендометрія. Так, відомі гени, відповідальні за спадкові форми ожиріння (HCHOLA3, CLF, FHCA), синд-

рому полікістозних яєчників (HSD3B2, FSHR, GCCR, FST), діабету (SLC2A1(GLUT1), SORBS1, GYS2, IRS2, HNF4A), гіпертонії (AGTR1, HNT4, CYP8). Хромосомна локалізація цих генів також збігалась з виявленими фрагільними сайтами. Таким чином, можна припустити, що спадкова обтяженість щодо екстрагенітальних захворювань може відігравати важливу роль у розвитку естрогензалежного раку ендометрія. Отже, врахування спадкових факторів схильності може мати велике значення в профілактиці і лікуванні на ранніх етапах розвитку раку ендометрія. Аналізуючи отримані результати, можна припустити, що частина обстежених хворих може мати гермінальні мутації в генах репарації (MSH6/GTBP, MSH2, RAD1, PMS1). На пізніх етапах розвитку пухлини можуть виявлятися соматичні мутації в генах, що контролюють клітинний цикл (hCDC4), у гені рецептора 2 фактора росту фібробластів, у генах інтерлейкінів, які беруть участь у патогенезі пухлини (IL10, IL8).

Природу загальних фрагільних сайтів до кінця не вивчено, деякі дослідники схильні вважати загальні фрагільні сайти частиною нормальної ДНК, інші ж звертають увагу на велику кількість динуклеотидних повторів (здебільшого АТ-динуклеотидів) у районах загальних фрагільних сайтів, що призводять до порушення реплікації [12; 15]. Деякі фолатчутливі фрагільні сайти були клоновані і містили велику кількість тандемних CGG мікросателітних повторів. Ці повтори здатні набувати незвичайної, не В-ДНК-структури, такої, як шпилька, спіраль, що зісковзнула (S-ДНК), або форму квадриплексної ДНК. Такі вторинні структури ДНК можуть порушувати елонгацію реплікації [6]. При спадковому неполіпозному раку товстої кишки (HNPCC) спостерігається



**Фрагільні сайти, що зустрічаються в хворих на рак ендометрія,  
а також відомі фрагільні сайти і гени з цих регіонів**

Фрагільний сайт	Передбачуваний тип фрагільного сайта	Відомі гени-кандидати, які беруть участь у розвитку раку ендометрія
1q2.5-4.1	FRA1G(1q25.1), амфідиколіновий, загальний	COX2 (ген циклооксигенази-2)
1p3.3-3.4	FRA1K(1q31), амфідиколіновий, загальний	IL10 (ген інтерлейкіну-10)
1p1.2	FRA1B(1p32), амфідиколіновий, загальний	SLC2A1(GLUT1) (переносник глюкози 1)
1q1.1	FRA1J(1q12), 5-азацитидиновий, загальний	TNFRSF1B (ген рецептора фактора некрозу пухлин)
2q2.4-3.1	FRA2G(2q31), амфідиколіновий, загальний	HCHOLA3 (ген гіперхолестеролемії)
2p1.5-2.2	FRA2D(2p16.2), амфідиколіновий, загальний	HSD3B2 (ген 3β-гідроксистероїд дегідрогенази)
3q2.6-27	FRA3C(3q27), амфідиколіновий, загальний	PMS1 (ген міс-мач репарації)
4q1.5	FRA4A(4p16.1), амфідиколіновий, загальний	COX-1 (ген циклооксигенази-1)
4q2.8-3.1	FRA4D(4q31.1), амфідиколіновий, загальний	GPD2 (ген гліцеролфосфатдегідрогенази)
5q2.3-3.2	FRA4E(4q27), некласифікований, загальний	MSH6/GTBP (ген міс-мач репарації)
5q1.6	FRA5C, амфідиколіновий, загальний	CYP1B1 (ген цитохромоксидази 450)
5p1.4	FRA5E, амфідиколіновий, загальний	COCA (ген, відповідальний за синдром Лінча)
6q2.6	FRA6E(6q26), амфідиколіновий, загальний	NF1 (нейрофіброматоз, тип 1)
9q1.1	FRA9F(9q12), 5-азацитидиновий, загальний	MSH2 (синдром Tuir-Morre)
10q1.1	FRA10G(10q11.2), амфідиколіновий, загальний	FSHR (ген рецептора фолікулостимулювального гормону)
10q2.5-2.6	FRA10E(10q25.2), амфідиколіновий, загальний	AGTR1 (ген рецептора ангіотензину)
12q1.1	FRA10F(10q26.1), амфідиколіновий, загальний	IL8 (ген інтерлейкіну-8)
13q2.1-2.2	FRA13B(13q21), BrdU-тип, загальний	hCDC4 (ген циклінозалежної кінази-2)
13q3.2	FRA13C(13q21.1), амфідиколіновий, загальний	GCCR (ген глюкокортикоїдного рецептора)
18q1.1	FRA13D(13q32), амфідиколіновий, загальний	RAD1 (білок контролю клітинного циклу, ДНК-репаруюча екзонуклеаза)
20p1.1	FRA20A(20p11), фолатчутливий, рідкісний	FST (ген фолістатину, синдром полікістозних яєчників)
Xq2.3-2.4	FRAXC(Xq22.1), амфідиколіновий, загальний	ER1 (ген естрогенового рецептора-1)
		FHCA (ген гіперхоланемії)
		PTEN (гомолог фосфатази і тензину)
		CYP17 (ген цитохрому P450)
		SORBS1 (ген гомолога сорбіну людини)
		FGFR2 (ген рецептора 2 фактора росту фібробластів)
		GYS2 (ген глікогенсинтетази)
		HYT4 (ген гіпертонії)
		CLF (ген холестеролзнижувального фактора)
		IRS2 (ген субстрату інсулінового рецептора)
		LCFS2 (синдром Lynch 2)
		HNF4A (ген нуклеарного фактора гепатоцитів, інсуліннезалежний діабет)
		CYP8 (ген простагландин-12-синтетази, гіпертонія)

*Примітка.* У таблиці використано інформацію електронних баз даних OMIM (Online Mendelian Inheritance on Men).

ся підвищена нестабільність тринуклеотидних повторів у тканині пухлини, що пов'язують із залученням у патогенез

цього спадкового захворювання генів, відповідальних за міс-мач репарацію ДНК [5]. Рак ендометрія входить до

складу спадкового синдрому Lynch або спадкового неполіпозного раку товстої кишки (HNPCC) [3]. Наводяться по-



відомлення про наявність фрагільних ділянок хромосом у лімфоцитах крові хворих на колоректальний рак [8].

Виявлено 22 сайти ламкості хромосом у хворих на рак ендометрія, більшість з них збігається з уже відомими сайтами [19]. Три сайти є невідомими: 1p1.2; 12q1.1; 18q1.1. Переважна більшість відомих виявлених сайтів є загальними, тільки один сайт (20p1.1) належить до спектра рідкісних фолатчутливих. Сайти фрагільності в хворих на рак ендометрія збігаються за хромосомною локалізацією з відомими генами, що беруть участь у патогенезі різних форм раку ендометрія, а також з генами, що сприяють розвитку цього захворювання. Можливо, що виявлені фрагільні сайти хромосом можуть бути цитогенетичними маркерами мутацій генів при раку ендометрія. Як відомо, фрагільні ділянки хромосом містять тандемно-повторювані ди- і тринуклеотидні повтори, при раку прямої кишки вони виявляються як динамічні мутації [4]. Рак ендометрія в обстежених нами пацієнток був на пізніх етапах розвитку, і ця обставина могла вплинути на спектр виявлення ламких сайтів — загальний (через наявність у крові пацієнток речовин-інгібіторів нуклеотидного обміну, продукованих пухлиною), а також сприяти соматичним мутаціям, що з'являються на пізніх етапах розвитку пухлини (гени інтерлейкінів, hCDC4, PTEN та ін.). Щоб перевірити цю гіпотезу, необхідні подальші дослідження пацієнток з різними формами гіперплазії ендометрія з урахуванням спадкової онкообтяженості та супровід-

них захворювань (діабет, гіпертонія, синдром полікістозних яєчників, ожиріння і т. ін.).

Таким чином, специфічні ламкі сайти хромосом можна вважати додатковим маркером ризику розвитку онкоза-хворювань. Вивчення гіпермутабельних районів нуклеотидних повторів (фрагільних сайтів) надалі приведе до розуміння індукованих ними порушень.

## ВИСНОВКИ

1. У хворих на рак ендометрія виявлено 22 сайти ламкості хромосом; більшість з них збігається з уже відомими фрагільними сайтами; три сайти є невідомими: 1p1.2; 12q1.1; 18q1.1.

2. Фрагільні сайти у хворих на рак ендометрія збігаються за хромосомною локалізацією з відомими генами, що беруть участь у патогенезі різних форм раку ендометрія, а також генів, що сприяють розвитку цього захворювання.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Медицинские лабораторные технологии: В 2-х томах* / Под ред. А. И. Карпищенко. — СПб., 1999.
2. *Несина И. П., Полищук Л.З., Олейниченко П. И.* Определение хромосомной сайт-ломкости в лимфоцитах периферической крови больных колоректальным раком с учетом отягощенности семейного анамнезу по онкопатологии // *Цитология и генетика*. — 2000. — Т. 34, № 1. — С. 3-9.
3. *Полищук Л. З., Несина И.П.* Структурные аберрации хромосом в лимфоцитах периферической крови у больных предраком и раком эндометрия // Там же. — 1995. — Т. 29, № 3. — С. 17-24.
4. *Common fragile sites: G-band characteristics within an R-band* / D. Mishmar, Y. Mandel-Gutfreund, H. Margalit et al. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 64. — P. 908-910.

5. *Hormonal interaction in endometrial cancer* / G. Emons, G. Fleckenstein, B. Hinney et al. // *Endocrine-Related Cancer*. — 2000. — Vol. 7. — P. 227-242.

6. *Kaaks R., Lukanova A., Kurzer M. S.* Obesity, endogenous hormones and endometrial cancer risk: a synthetic review // *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. — 2002. — Vol. 11. — P. 1531-1543.

7. *Kim Y. I.* Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? // *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. — 2004. — Vol. 13, N 4. — P. 511-519.

8. *Lax S. F.* Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification // *Virchows Arch*. — 2004. — Vol. 444. — P. 213-223.

9. *Lindor N. M., Greene M. H.* Special article. The concise handbook of family cancer syndromes // *J. Nat. Cancer Inst.* — 1998. — Vol. 14. — P. 1039-1071.

10. *Molecular basis for expression of common and rare fragile sites* / E. Zlotorinski, A. Rahat, J. Skaug et al. // *Molecular and cellular biology*. — 2003. — Vol. 23, N 20. — P. 7143-7151.

11. *Monckton D. G., Caskey C. T.* Unstable triplet repeat diseases // *Circulation*. — 1995. — Vol. 91. — P. 513-520.

12. *Sutherland G. R., Richards R. I.* Simple tandem DNA repeats and human genetic disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — Vol. 92. — P. 3636-3641.

13. *Sutherland G. R., Richards R. I.* HUMAN GENETICS'99: TRINUCLEOTIDE REPEATS Fragile Sites — Cytogenetic Similarity with Molecular Diversity // *Am. J. Hum. Genet.* — 1999. — Vol. 64. — P. 354-359.

14. *Smith D. I., Huang H., Wang L.* Common fragile sites and cancer // *Int. J. Oncol.* — 1998. — Vol. 12, N 1. — P. 187-196.

15. *The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in woman* / S. F. Charles, W. C. Willett, G. A. Colditz et al. // *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. — 2002. — Vol. 11. — P. 227-234.

