

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ПОГРАНИЧНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ

[А. Н. Васильев^{2,4}, Л. А. Мостович¹, Л. Ф. Гуляева¹, С. Э. Красильников^{3,4}, В. Е. Войццкий^{3,4},
А. П. Кулиджанян³, А. В. Герасимов³, В. Г. Сисакян³](#)

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»
(г. Новосибирск)

²ГБУЗ НСО «Городская поликлиника № 29» (г. Новосибирск)

³ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер» (г. Новосибирск)

⁴ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава
России (г. Новосибирск)

Методом ОТ-ПЦР в реальном времени исследована экспрессия генов белков внеклеточного матрикса остеопонтина и тромбоспондина-1 в тканях пограничных, злокачественных и доброкачественных опухолей яичников. Показано достоверное ($p < 0,05$) увеличение уровня мРНК изоформ остеопонтина *OPNa* (в 14,5 и 4,7 раза) и *OPNb* (в 11,3 и 27,2 раза) как в образцах тканей рака яичников, так и в образцах пограничных опухолей по сравнению с кистой яичников. Для тромбоспондина-1 была обнаружена тенденция к снижению уровня экспрессии (в 3,0 раза в пограничных опухолях яичников и в 27,2 раза в раке яичников) с повышением агрессивности опухолевых тканей. Таким образом, белки *OPNa* и *OPNb* могут рассматриваться как потенциальные молекулярные маркеры опухолей яичников.

Ключевые слова: пограничные опухоли яичников, диагностика, экспрессия, остеопонтин *OPNa* и *OPNb*, тромбоспондин-1, маркеры агрессивности опухолей.

Васильев Андрей Николаевич — аспирант кафедры онкологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», врач-онколог ГБУЗ НСО «Городская поликлиника № 29», e-mail: andr0005@mail.ru

Мостович Людмила Андреевна — научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики», e-mail: mostovichl@gmail.com

Гуляева Людмила Федоровна — доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБУ «НИИ молекулярной

биологии и биофизики», e-mail: lfgulyaeva@gmail.com

Красильников Сергей Эдуардович — доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», заведующий онкогинекологическим отделением ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер», e-mail: andr0005@mail.ru

Войцицкий Владимир Евгеньевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», главный врач ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер», e-mail: andr0005@mail.ru

Кулиджанян Ани Павликовна — врач-онколог, ординатор отделения онкогинекологии ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер», e-mail: kulidzhanyan.ani@mail.ru

Герасимов Алексей Владимирович — кандидат медицинских наук, врач-онколог высшей категории, старший ординатор отделения онкогинекологии ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер», e-mail: dr.gerasimov@yandex.ru

Сисакян Вираз Гегамович — кандидат медицинских наук, врач-онколог первой категории, ординатор отделения онкогинекологии ГБУЗ НСО «Новосибирский областной онкологический диспансер», e-mail: sisakyan@mail.ru

Введение. Злокачественные опухоли яичников занимают четвертое место среди злокачественных опухолей репродуктивной системы у женщин. Смертность от рака яичников составляет более 50 % от выявленных случаев.

Среди всех злокачественных опухолей яичников, в плане благоприятного клинического течения, прогноза и возможности проведения органосохраняющего лечения, с сохранением репродуктивной функции, обращает на себя внимание группа пограничных опухолей, доля которых может составлять 15–23 % [1]. Обычно эти опухоли яичников встречаются у женщин репродуктивного возраста, выявляются на ранних стадиях (у 80 % пациенток выявляется I ст. заболевания), имеют благоприятный клинический прогноз, что позволяет провести органосохраняющее лечение и реализовать репродуктивную функцию пациенток [2]. Клиническая диагностика пограничных опухолей, как и рака яичников, затруднена из-за отсутствия патогномоничных симптомов, а результаты лучевых методов диагностики (УЗИ, МРТ, КТ) на дооперационном этапе позволяют только отнести опухолевые образования в малом тазу по ряду признаков к группе повышенного онкологического риска. По этой причине диагноз пограничной опухоли может быть достоверно установлен только по итогам послеоперационного морфологического исследования. В связи с этим до 40 % операций у пациенток с пограничными опухолями проводится непрофильно в гинекологических стационарах без точного стадирования опухолевого процесса [2].

Для оценки степени агрессивности, возможности проведения органосохраняющей терапии и определения эффективности проводимой терапии в настоящее время проводится поиск новых опухолевых маркеров с использованием методов молекулярной биологии. Например изучаются мутации важных регуляторных генов *Braf*, *Kras*, *p53*, *PTEN*. В качестве прогностических критериев проводится исследование экспрессии белков, участвующих в регуляции пролиферации (Ki-67, циклины и др.) и апоптоза (bcl-2,

bcl-x, bak, bax, сурвивин). Такими прогностическими маркерами могут являться компоненты экстраклеточного матрикса: остеопонтин (изоформы OPNa, OPNb и OPNc) и тромбоспондин-1 (TSP-1) [3, 4]. Известно, что эти белки принимают активное участие в процессах канцерогенеза. Во многих изученных типах рака наблюдается корреляция уровня экспрессии остеопонтина (особенно изоформы OPNc) и тромбоспондина-1 с агрессивностью течения заболевания. Впервые остеопонтин был идентифицирован в клетках рака яичников с помощью ДНК-микрочипов, используемых для выявления генов с повышенными уровнями экспрессии. При этом оказалось, что он может быть потенциальным диагностическим маркером рака яичников. В ряде исследований было показано, что уровень остеопонтина в плазме у больных с эпителиальным раком яичников был значительно выше, чем у больных с доброкачественными опухолями и с другим видами гинекологических опухолей [5].

Целью исследования являлось определение экспрессии генов остеопонтина и тромбоспондина-1 с целью использования их как потенциальных маркеров для диагностики и лечения пограничных опухолей яичников.

Материалы и методы. На базе Новосибирского областного онкологического диспансера была сформирована выборка послеоперационных образцов опухолевых тканей яичников. Всего было проанализировано 30 образцов, которые были разделены на 3 группы: рак яичников (T3N0M0), $n = 12$; пограничная опухоль яичников (T1N0M0), $n = 10$, и киста яичников, $n = 8$. Уровень экспрессии исследуемых генов был проанализирован методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием значений пороговых циклов Ct с учетом эффективности реакций исследуемого гена и генов «домашнего хозяйства» GAPDH и β -актина. Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0. Для оценки достоверности различий между группами использовался критерий Манна-Уитни. Для количественных признаков общее межгрупповое различие оценивалось при помощи критерия Крускала-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования показали достоверное ($p < 0,05$) увеличение уровня мРНК изоформ остеопонтина OPNa и OPNb как в образцах тканей рака яичников, так и в образцах пограничных опухолей, по сравнению с образцами кист яичников. Уровень экспрессии обеих изоформ был значительно (OPNa в 3,1 раза, $p = 0,014005$; OPNb в 2,4 раза, $p = 0,034565$) повышен в образцах пограничных опухолей по сравнению с раком яичника. В то же время мРНК изоформы OPNc отсутствовала во всех образцах кист яичников, тогда как в тканях рака яичника наблюдалось значительное повышение уровня экспрессии по сравнению с тканями пограничных опухолей (в 14,2 раза, $p = 0,000754$). Для тромбоспондина-1 была обнаружена тенденция к снижению уровня экспрессии с повышением агрессивности опухолевых тканей. В образцах тканей кисты отмечен наибольший уровень экспрессии гена TSP1 (4,02), а наименьший (0,11) — в образцах рака яичника. Известно, что в большинстве случаев для изоформ остеопонтина характерен транскрипционный механизм регуляции активности [11]. Тогда изменения на уровне мРНК могут отражать изменения на уровне белка. Тем не менее, для подтверждения возможности использования изоформ остеопонтина как маркеров опухолей яичника планируется дальнейшее исследование с применением иммуногистохимического анализа.

Заключение. Профиль экспрессии генов изоформ остеопонтина и тромбоспондина-1 зависит от типа новообразований яичников. Пограничные опухоли яичников характеризуются наибольшим уровнем мРНК изоформ OPNa и OPNb. Уровень экспрессии OPNc выше в образцах тканей рака яичников по сравнению с пограничными опухолями и не обнаруживается в образцах кист яичников. Уровень экспрессии

тромбоспондина-1 имеет тенденцию к снижению при повышении агрессивности опухолевых тканей.

Очевидно, что дальнейшее исследование белков внеклеточного матрикса позволит выделить совокупность факторов, определяющих биологическую агрессивность этих опухолей, и окажет существенную помощь клиницистам в принятии решений.

Список литературы

1. Бохман Я. В. Лекции по онкогинекологии / Я. В. Бохман. — М. : Медицинское информационное агентство, 2007. — 167 с.
2. Новикова Е. Г. Пограничные опухоли яичников / Е. Г. Новикова, Г. Ю. Батталова. — М. : Медицинское информационное агентство, 2007. — 151 с.
3. Тюляндин С. А. Практическая онкология : избранные лекции / С. А. Тюляндин, В. М. Моисеенко. — СПб. : Центр ТОММ, 2004. — 784 с.
4. Клиническое руководство национальной академии клинической биохимии США по применению маркеров опухолей яичка, предстательной железы, прямой и ободочной кишки, молочной железы и яичников в медицинских лабораториях / Катарина М. Стерджен [и др.] // Лаб. диагностика. — 2013. — № 3. — С. 3-13.
5. Role of osteopontin in differential diagnosis of ovarian tumors / R. Moszynski [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Res. — 2013 Nov. — Vol. 39 (11). — P. 1518-25.
6. Evaluation of osteopontin and CA125 in detection of epithelial ovarian carcinoma / M. Milivojevic [et al.] // Eur. J. Gynaecol. Oncol. — 2013. — Vol. 34 (1). — P. 83-5.
7. Combination of serum biomarkers to differentiate malignant from benign ovarian tumours / G. He [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Can. — 2012 Jun. — Vol. 34 (6). — P. 567-74.
8. Usefulness of osteopontin (OPN) determinations in ovarian cancer patients who underwent first-line chemotherapy / J. Mrochem-Kwarciak [et al.] // Ginekol Pol. — 2011 Dec. — Vol. 82 (12). — P. 911-7.
9. Correlation between ovarian neoplasm and serum levels of osteopontin: a meta-analysis / Y. D. Wang [et al.] // Tumour Biol. — 2014 Dec. — Vol. 35 (12). — P. 11799-808.
10. Changes in the transcriptional profile in response to overexpression of the osteopontin-c splice isoform in ovarian (OvCar-3) and prostate (PC-3) cancer cell lines / T. M. Tilli [et al.] // BMC Cancer. — 2014. — Vol. 14. — P. 433.
11. Gimba E. R. Human osteopontin splicing isoforms : known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways / E. R. Gimba, T. M. Tilli // Cancer Lett. — 2013 Apr. — Vol. 30, N 331 (1). — P. 11-7.

MODERN MOLECULAR AND BIOLOGICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF BORDERLINE OVARIAN TUMOURS

[A. N. Vasilyev^{2,4}, L. A. Mostovich¹, L. F. Gulyaeva¹, S. E. Krasilnikov^{3,4}, V. E. Voytsitsky^{3,4}, A. P. Kulidzhanyan³, A. V. Gerasimov³, V. G. Sisakyan³](#)

¹FSBE «Scientific research institute of molecular biology and biophysics» SB RAMS (Novosibirsk)

²NRSBHE «City out-patient clinic N 29» (Novosibirsk)

³NRSBHE «Novosibirsk Regional Oncological Clinic» (Novosibirsk)

⁴SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk)

An expression of proteins genes of extracellular matrix of osteopontin and thrombospondin-1 in fabrics of borderline, malignant and benign tumors of ovaries were investigated by the RT-PCR method in real time. There was shown a reliable ($p < 0,05$) increase in the isoforms mRNA level on osteopontin of OPNa (in 14,5 and 4,7 times) and OPNb (in 11,3 and 27,2 times) both in samples of fabrics of ovarian cancer, and in samples of borderline tumors in comparison with cystoma ovaries. The tendency to decrease in level of expression (by 3,0 times in borderline ovarian tumors and by 27,2 times in ovarian cancer) with increase of aggression of tumoral fabrics was registered for for thrombospondin-1. Thus, OPNa and OPNb proteins can be considered as potential molecular markers of ovarian tumors.

Keywords: borderline ovarian tumors, diagnostics, expression, osteopontin OPNa and OPNb, thrombospondin-1, markers of tumor aggressivity.

About authors:

Vasilyev Andrey Nikolaevich — post-graduate student of oncology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», oncologist at NRSBHE «City out-patient clinic N 29», e-mail: andr0005@mail.ru

Mostovich Lyudmila Andreevna — research associate of laboratory of molecular mechanisms of carcinogenesis at FSBE «Scientific research institute of molecular biology and biophysics» SB RAMS, e-mail: mostovichl@gmail.com

Gulyaeva Lyudmila Fiodorovna — doctor of biological science, professor, head of laboratory of molecular mechanisms of carcinogenesis at FSBE «Scientific research institute of molecular biology and biophysics» SB RAMS, e-mail: lfgulyaeva@gmail.com

Krasilnikov Sergey Eduardovich — doctor of medical science, professor of oncology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», head of oncogynecological department at NRSBHE «Novosibirsk Regional Oncological Clinic», e-mail: andr0005@mail.ru

Voytsitsky Vladimir Evgenyevich — doctor of medical sciences, professor, head of oncology chair at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», chief physician at NRSBHE «Novosibirsk Regional Oncological Clinic», e-mail: andr0005@mail.ru

Kulidzhanyan Ani Pavlikovna — oncologist, attending physician of oncogynecological department at NRSBHE «Novosibirsk Regional Oncological Clinic», e-mail: kulidzhanyan.ani@mail.ru

Gerasimov Alexey Vladimirovich — candidate of medical science, oncologist of the highest category, senior attending physician of oncogynecological department at NRSBHE «Novosibirsk Regional Oncological Clinic», e-mail: dr.gerasimov@yandex.ru

Sisakyan Virab Gegamovich — candidate of medical science, oncologist of the first category, attending physician of oncogynecological department at NRSBHE «Novosibirsk Regional Oncological Clinic», e-mail: sisakyan@mail.ru

List of the Literature:

1. Bokhman Y. V. Lectures on oncogynecology / Y. V. Bokhman. — M. : Medical news agency, 2007. — 167 p.
2. Novikova E. G. Borderline ovaian tumors / E. G. Novikova, G. Y. Battalov. — M. : Medical news agency, 2007. — 151 p.
3. Tyulyandin S. A. Practical oncology : selected lectures / S. A. Tyulyandin, V. M. Moiseenko. — SPb. : TOMM center, 2004. — 784 p.
4. Clinical guide of national academy of clinical biochemistry of the USA on application of markers of ovarian tumors, prostate gland, straight line and segmented intestine, mammary gland and ovaries in medical laboratories / Catharina M. Sterdzhen [et al.] // Lab. diagnostics. — 2013. — N 3. — P. 3-13
5. Role of osteopontin in differential diagnosis of ovarian tumors / R. Moszynski [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Res. — 2013 Nov. — Vol. 39 (11). — P. 1518-25.
6. Evaluation of osteopontin and CA125 in detection of epithelial ovarian carcinoma / M. Milivojevic [et al.] // Eur. J. Gynaecol. Oncol. — 2013. — Vol. 34 (1). — P. 83-5.
7. Combination of serum biomarkers to differentiate malignant from benign ovarian tumours / G. He [et al.] // J. Obstet. Gynaecol. Can. — 2012 Jun. — Vol. 34 (6). — P. 567-74.
8. Usefulness of osteopontin (OPN) determinations in ovarian cancer patients who underwent first-line chemotherapy / J. Mrochem-Kwarciak [et al.] // Ginekol Pol. — 2011 Dec. — Vol. 82 (12). — P. 911-7.
9. Correlation between ovarian neoplasm and serum levels of osteopontin: a meta-analysis / Y. D. Wang [et al.] // Tumour Biol. — 2014 Dec. — Vol. 35 (12). — P. 11799-808.
10. Changes in the transcriptional profile in response to overexpression of the osteopontin-c splice isoform in ovarian (OvCar-3) and prostate (PC-3) cancer cell lines / T. M. Tilli [et al.] // BMC Cancer. — 2014. — Vol. 14. — P. 433.
11. Gimba E. R. Human osteopontin splicing isoforms : known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways / E. R. Gimba, T. M. Tilli // Cancer Lett. — 2013 Apr. — Vol. 30, N 331 (1). — P. 11-7.