

А. А. Моисеев¹, А. В. Хрунин², Е. М. Павлюшина³, Н. А. Пирогова¹,
В. А. Горбунова¹, С. А. Лимборская²

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ И РЕЗУЛЬТАТЫ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

¹ НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

² Институт молекулярной генетики РАН, Москва

³ Кафедра оториноларингологии ММА им. И. М. Сеченова, Москва

Глутатион-S-трансферазы участвуют в инактивации многих цитостатиков, включая цисплатин. Полиморфизм кодирующих их генов может влиять на эффективность и токсичность химиотерапии. Мы изучили полиморфизм генов *GSTP1* (Ile¹⁰⁵Val, Ala¹¹⁴Val), *GSTA1* (–69C / T), *GSTM1* и *GSTT1* (делеции) у 80 больных раком яичников, получавших цисплатин и циклофосфамид. Отмечена ассоциация полиморфизма *GSTP1* Ile¹⁰⁵Val и времени до прогрессирования: при генотипе Ile / Ile оно было статистически значимо больше, чем при генотипах Ile / Val и Val / Val. Медиана продолжительности жизни не была достигнута ни в одной из групп, однако наблюдалась тенденция к ее увеличению в случае генотипа Ile / Ile. Кроме того, выявлено снижение риска развития клинически значимой анемии у больных с делецией гена *GSTM1*.

Ключевые слова: рак яичников, химиотерапия, цисплатин, глутатион-S-трансфераза.

Одна из основных тенденций современной химиотерапии — выработка индивидуального подхода к подбору цитостатиков, направленного на повышение эффективности и ограничение токсичности лечения. Традиционные прогностические факторы не позволяют прогнозировать, какие препараты окажутся эффективными у данного больного, и их выбор носит в известной мере эмпирический характер, из-за чего может постепенно развиваться полирезистентность опухоли, а больной испытывает постоянно усиливающиеся побочные действия. При этом переносимость лечения варьирует в широких пределах. Расчеты показывают, что почти 95% индивидуальных различий в эффективности и токсичности цитостатиков могут быть генетически обусловленными [3].

Рак яичников относится к опухолям со сравнительно высокой чувствительностью к химиотерапии, особенно к препаратам платины. В то же время у многих больных стандартные схемы изначально оказываются неэффективными или вызывают тяжелые побочные эффекты. Настоящее исследование направлено на изучение генетических факторов, которые позволили бы прогнозировать чувствительность опухоли к цисплатину и риск развития тяжелых осложнений.

Один из ключевых факторов, влияющих на цитотоксическое действие цисплатина, — инактивация внутри клетки его активных метаболитов путем связы-

вания с тиоловыми группами глутатиона, в результате чего образуется нетоксичный конъюгат, выводимый из клетки. Эти реакции катализируются глутатион-S-трансферазами [14]. У человека описаны несколько изоформ этих ферментов (A1, M1, P1, T1 и др.), каждая из которых кодируется своим геном (соответственно *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*).

Гены глутатион-S-трансфераз характеризуются выраженным природным полиморфизмом, обусловленным различиями в последовательности нуклеотидов. Наиболее изучен делеционный полиморфизм генов *GSTT1* и *GSTM1*, при котором соответствующие белки не образуются. Полиморфизм других генов (*GSTA1*, *GSTP1* и др.) представлен главным образом однонуклеотидными заменами. Примерно 50% лиц европеоидной расы — гомозиготы по делеции гена *GSTM1*, около 15% — по делеции гена *GSTT1*. Для гена *GSTP1* описаны два распространенных полиморфизма: Ile¹⁰⁵Val (замена изолейцина на валин в 105-м положении) и Ala¹¹⁴Val (замена аланина на валин в 114-м положении). Аллель *GSTP1*¹⁰⁵Val достаточно распространен: он имеется почти у 50% лиц европеоидной расы, причем 10—15% составляют гомозиготы; аллель *GSTP1*¹¹⁴Val более редок. Полиморфизм гена *GSTA1* –69C / T заключается в замене цитозина на тимин в промоторе, в результате чего снижается уровень экспрессии гена и образуется меньше белка, хотя его структура не меняется. За счет этих полиморфизмов детоксикационная способность глутатионтрансфераз у некоторых людей оказывается существенно сниженной, что может повышать чувствительность к химиотерапии и при этом ухудшать ее переносимость [9].

В представленной работе мы изучили влияние вариантов вышеописанного полиморфизма генов глутатион-S-трансфераз на токсичность и эффективность цисплатина при лечении больных раком яичников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническая часть работы проходила в отделении химиотерапии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. В исследование включали женщин моложе 65 лет с верифицированным эпителиальным раком яичников, независимо от стадии. После подписания информированного согласия на лечение больные проходили обследование для оценки распространенности опухоли (осмотр гинеколога, УЗИ брюшной полости и малого таза и определение маркера СА-125; при необходимости — другие исследования).

Перед началом химиотерапии больные сдавали кровь для генетического анализа. Образцы доставляли в Институт молекулярной генетики РАН, где из цельной крови методом фенолхлороформной экстракции [10] выделяли ДНК. Полиморфные районы генов *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием следующих праймеров: 5'-TGT TGA TTG TTT GCC TGA AAT T-3' и 5'-GTT AAA CGC TGT CAC CGT CCT-3' (*GSTA1*) [2]; 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' и 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3' (*GSTM1*) [1]; 5'-GTA GTT TGC CCA AGG TCA AG-3' и 5'-AGC CAC CTG AGG GGT AAG-3' (*GSTP1* Ile¹⁰⁵Val) [5], 5'-ACA GGA TTT GGT ACT AGC CT-3' и 5'-AGT GCC TTC ACA TAG TCA TCC TTG CGC-3' (*GSTP1* Ala¹¹⁴Val) [13]; 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' и 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3' (*GSTT1*) [1].

Для амплификации фрагментов генов *GSTT1* и *GSTM1* проводили мультиплексную ПЦР, в которой в качестве внутреннего контроля использовали амплификацию участка 4-го экзона гена ГТФ-циклогидролазы 1 (праймеры: 5'-GTC CTT TTT GTT TTA TGA GGA AGG C-3' и 5'-GGT GAT GCA CTC TTA TAA TCT CAG C-3'). Продукты мультиплексной ПЦР непосредственно использовали для анализа генотипов *GSTT1* и *GSTM1*. Для генов *GSTA1* и *GSTP1* продукты ПЦР подвергали расщеплению с помощью соответствующих эндонуклеаз рестрикции (Eam1104I [2], Alw26I [5] и Bsh1236I [13], Fermentas AB, Вильнюс, Литва) с последующим генотипированием тестируемых полиморфных локусов, основанном на оценке различия длин рестриционных фрагментов. Анализ продуктов амплификации и рестрикции проводили с помощью электрофореза в 2,5% агарозном геле.

Все больные получали одну и ту же стандартную химиотерапию по схеме цисплатин 100 мг/м² + циклофосфамид 600 мг/м². После каждых 2 курсов назначали обследование для оценки эффекта (включая УЗИ брюшной полости и малого таза и определение СА-125, по показаниям — другие методы); во время каждого регистрировали побочные действия на основании клинических данных, результатов анализов крови и аудиологического

исследования. Аудиометрию проводили с помощью аппарата МА-31 фирмы «Pracitronik» (Германия) по стандартной методике. Лечение завершали после 6 курсов, а также в случае тяжелой токсичности или прогрессирования заболевания (таким больным назначали химиотерапию второй линии вне рамок исследования). Больные, завершившие химиотерапию, переходили в период наблюдения для оценки времени до прогрессирования и продолжительности жизни.

Полученные данные были сопоставлены с результатами генетического анализа. Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия χ^2 , для малых выборок рассчитывали точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Кривые продолжительности жизни были построены по методу Каплана—Мейера, для сравнения между группами использовали логранговый критерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение 2003—2006 гг. в исследование были включены 80 больных в возрасте 23—65 лет (медиана 52 года). Исключены были 3 больные: у одной был выявлен сопутствующий хронический миелолейкоз, двое отказались от лечения после первого цикла. Таким образом, анализировали данные 77 больных.

Распределение по стадиям рака яичников было следующим: I стадия — 12 больных, II стадия — 5, III стадия — 50 и IV стадия — 10. Химиотерапию до операции получали 24 больных, после операции — 53. В последней группе у 19 больных химиотерапия была адъювантной (после радикальной операции), у 34 — лечебной (после операции сохранялась остаточная опухоль или повышенный уровень маркера СА-125). Соответственно эффект химиотерапии подлежал оценке у 58 больных.

Результаты генетического анализа представлены в таблице.

Сопоставление генетических данных с параметрами эффективности и токсичности химиотерапии позволило выявить ассоциацию полиморфизма гена *GSTP1* Ile¹⁰⁵Val с результатами химиотерапии. Статистически значимыми оказались различия по времени до прогрессирования между гомозиготами по аллелю *GSTP1*¹⁰⁵Ile (генотип Ile / Ile), гетерозиготами (генотип Ile/Val) и гомозиготами по аллелю *GSTP1*¹⁰⁵Val (генотип Val / Val) (χ^2 , $p = 0,029$; рис. 1). Наиболее заметными были различия между группами Ile / Ile и Ile / Val (логранговый критерий, $p = 0,0016$). При этом обращало на себя внимание расхождение кривых после 1-го года наблюдения. Медиана времени до прогрессирования в группе Ile / Ile не была достигнута, в группе Ile / Val составила лишь 9 мес, в группе Val / Val — 18 мес. Медиана продолжительности жизни не была достигнута ни в одной из групп, однако отмечалась тенденция к ее увеличению у женщин с генотипом Ile / Ile, у которых расхождение кривых началось через 2 года (рис. 2).

Таблица
Распределение обследованных больных по генотипам

Полиморфизм	Генотип	Число больных
<i>GSTP1</i> Ile ¹⁰⁵ Val	Ile / Ile	33
	Ile / Val	37
	Val / Val	7
<i>GSTP1</i> Ala ¹¹⁴ Val	Ala / Ala	60
	Ala / Val	17
	Val / Val	0
<i>GSTA1</i> -69C / T	C / C	36
	C / T	32
	T / T	9
<i>GSTM1</i> del	- / -	36
	+ / -, + / +	41
<i>GSTT1</i> del	- / -	15
	+ / -, + / +	62

Зависимость между непосредственной эффективностью химиотерапии и тем или иным полиморфизмом отсутствовала.

При сопоставлении параметров токсичности (лейко- и нейтропении, тромбоцитопении, анемии, тошноты и рвоты, нейро-, ото- и нефротоксичности) с исследованными полиморфизмами гена *GSTP1* статически значимые корреляции не выявлены. В то же время отмечен повышенный риск ототоксичности у гомозигот по аллелю *GSTP1*¹⁰⁵Val: снижение слуха было выявлено у 4 из 7 женщин с таким генотипом (по данным аудиометрии, в одном случае — III степени, в 2 — II степени и в одном — I степени). При этом у гомозигот по аллелю *GSTP1*¹⁰⁵Ile (генотип Ile / Ile) это осложнение наблюдалось в 7 случаях из 33, а при генотипе Ile / Val — в 5 случаях из 37.

Наконец, обнаружена связь клинически значимой анемии (II степени и более) с наличием нормального гена *GSTM1*, тогда как при делеции этого гена указанное осложнение встречалась реже (χ^2 , $p = 0,016$). Полиморфизм генов *GSTA1* и *GSTT1* не коррелировал с исследованными параметрами токсичности и эффективности химиотерапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о существенном сокращении времени до прогрессирования и,

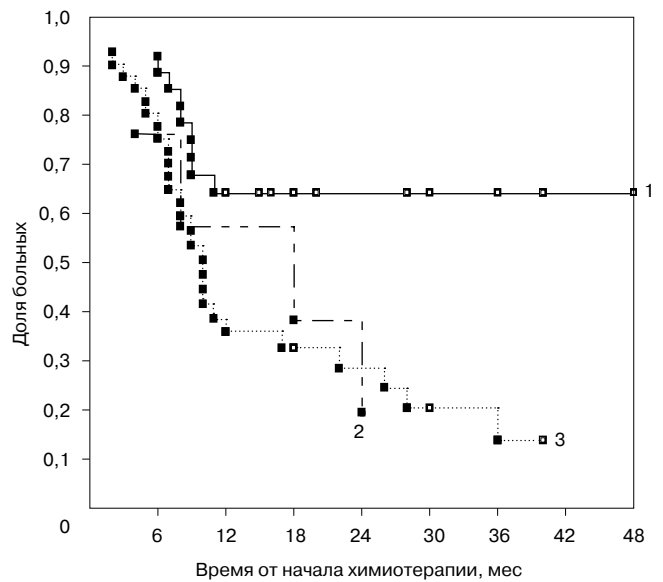


Рисунок 1. Время до прогрессирования в зависимости от полиморфизма гена *GSTP1* Ile¹⁰⁵Val. Черными квадратами отмечены больные с прогрессированием, белыми — больные без прогрессирования заболевания. 1 — Ile / Ile; 2 — Val / Val; 3 — Val / Ile.

возможно, продолжительности жизни у больных раком яичников при наличии аллеля *GSTP1*¹⁰⁵Val. Этот результат может иметь большое практическое значение и поэтому заслуживает подробного обсуждения.

Среди глутатион-S-трансфераз изофермент P1 наиболее активен в нормальных и опухолевых тканях, поэтому полиморфизм гена *GSTP1* способен заметно изменять суммарную активность этой ферментной системы. Однако конечный эффект зависит от варианта аминокис-

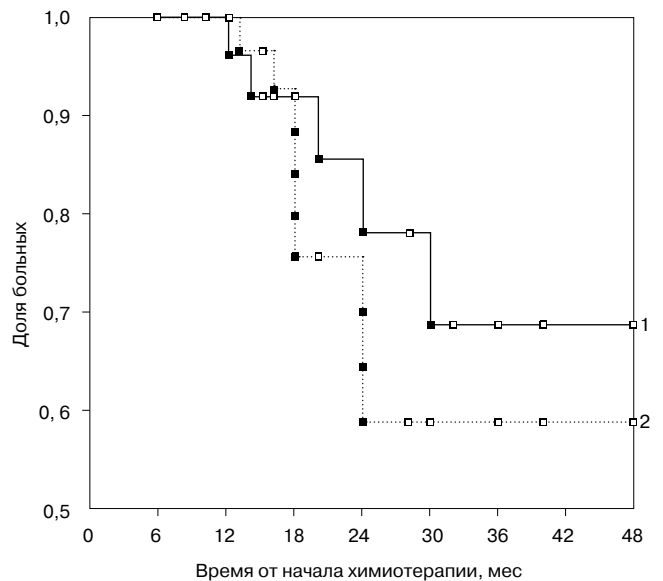


Рисунок 2. Продолжительность жизни в зависимости от полиморфизма гена *GSTP1* Ile¹⁰⁵Val. Черными квадратами отмечены умершие больные, белыми — больные, которые живы. 1 — Ile / Ile; 2 — Val / Ile.

лотной замены, которая может приводить к снижению активности фермента в отношении одних субстратов и ее увеличению в отношении других. В эксперименте *in vitro* аллель *GSTP1*^{105Val} защищал *Escherichia coli* от действия цисплатина и карбоплатина лучше, чем аллель *GSTP1*^{105Ple}, при использовании же алкилирующих средств результаты были противоположными [6]. Клинические исследования дали неоднозначные результаты. Показано, что аллель *GSTP1*^{105Val} улучшал результаты химиотерапии рака молочной железы с использованием алкилирующих средств [16], в то же время он был сопряжен со снижением продолжительности жизни при раке пищевода и яичников у больных, получавших схемы с цисплатином [4; 8]. Кроме того, у носителей аллеля *GSTP1*^{105Val} отмечалось снижение риска нейро- и ототоксичности на фоне схем с цисплатином и оксалиплатином [7; 11]. Указанные результаты согласуются с экспериментальными данными о повышенной способности фермента, кодируемого аллелем *GSTP1*^{105Val}, к инактивации цисплатина [6]. Однако в ряде работ аллель *GSTP1*^{105Val} увеличивал чувствительность к оксалиплатину и продолжительность жизни при раке толстой кишки [12; 15].

Данные, полученные в настоящем исследовании, указывают на отрицательное влияние аллеля *GSTP1*^{105Val} на результаты химиотерапии при раке яичников. Кажущееся противоречие с некоторыми данными литературы [12; 15] может объясняться различиями в механизме цитотоксичности цисплатина и оксалиплатина. Можно предположить, что описанная в эксперименте [6] повышенная способность фермента, кодируемого аллелем *GSTP1*^{105Val}, к инактивации цисплатина и карбоплатина не распространяется на оксалиплатин. В таком случае оксалиплатин может оказаться удачной альтернативой цисплатину у носителей аллеля *GSTP1*^{105Val}. Несомненно, эта гипотеза нуждается в экспериментальной и клинической проверке.

Нам не удалось обнаружить защитного действия аллеля *GSTP1*^{105Val} в отношении нейротоксичности и ототоксичности, на которое указывали другие авторы [7; 11]. Более того, у гомозигот по этому аллелю нарушение слуха возникало даже чаще, чем при остальных генотипах, хотя различия не были статистически значимыми.

Снижение риска развития анемии при делеции *GSTM1* оказалось несколько неожиданным: теоретически можно было ожидать усиления токсического действия цисплатина у таких больных. Мы не обнаружили данных литературы о влиянии гена *GSTM1* на риск развития анемии. Так или иначе, прежде чем обсуждать клиническую значимость этой ассоциации, необходимо ее подтверждение в других работах.

Отсутствие корреляции результатов химиотерапии с полиморфизмом *GSTP1* Ala¹¹⁴Val может объясняться низкой распространенностью аллеля *GSTP1*¹¹⁴Val: в изученной группе больных не было обнаружено ни одной гомо-

зиготы по нему. В то же время вклад других изоформ (A1 и T1) в суммарную активность глутатион-S-трансфераз может быть не столь велик, чтобы отсутствие или снижение активности одного из них существенно влияло на способности организма к детоксикации цисплатина.

В любом случае в перспективе исследование системы глутатион-S-трансфераз — наряду с другими генетическими факторами — может помочь при выборе оптимального режима химиотерапии, позволит достичь максимального противоопухолевого эффекта и снизить риск осложнений.

Работа выполнена при поддержке программ «Молекулярная и клеточная биология» и «Фундаментальные науки — медицине» Российской академии наук, грантов Президента РФ (МК-3955.2007.4) и РФФИ (№ 07-04-00027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Попов С. Н., Сломинский П. А., Галушкин С. Н. и др. Полиморфизм глутатион-S-трансфераз M1 и T1 в ряде популяций России // Генетика. — 2001. — Т. 38. — С. 281—284.
2. Coles B. F., Morel F., Rauch C. et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression // Pharmacogenetics. — 2001. — Vol. 11. — P. 663—669.
3. Evans W. E., McLeod H. L. Pharmacogenomics — drug disposition, drug targets, and side effects // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 348. — P. 538—548.
4. Howells R. E., Dhar K. K., Hoban P. R. et al. Association between glutathione-S-transferase GSTP1 genotypes, GSTP1 over-expression, and outcome in epithelial ovarian cancer // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2004. — Vol. 14. — P. 242—250.
5. Ishii T., Matsuse T., Teramoto S. et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease // Thorax. — 1999. — Vol. 54. — P. 693—696.
6. Ishimoto T.M., Ali-Osman F. Allelic variants of the human glutathione S-transferase P1 gene confer differential cytoprotection against anticancer agents in *E. coli* // Pharmacogenetics. — 2002. — Vol. 12. — P. 543—553.
7. Lecomte T., Landi B., Beaune P. et al. **Glutathione S-Transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy** // Clin. Cancer Res. — 2006. — Vol. 12. — P. 3050—3056.
8. Lee J. M., Wu T. M., Lee Y. C. et al. Association of GSTP1 Polymorphism and Survival for Esophageal Cancer // Clin. Cancer Res. — 2005. — Vol. 11. — P. 4749—4753.
9. McIlwain C. C., Townsend D.M., Tew K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy // Oncogene. — 2006. — Vol. 25. — P. 1639—1648.
10. Milligan B. G. Total DNA isolation / Hoelzel A. R. (ed.). Molecular genetic analysis of populations. — London: Oxford University Press, 1998. — P. 29—60.
11. Oldenburg J., Kraggerud S. M., Cvancarova M. et al. **Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione S-transferase genotypes in testicular cancer survivors** // J. Clin. Oncol. — 2007. — Vol. 25. — P. 708—714.
12. Ruzzo A., Graziano F., Loupakis F. et al. **Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX4 chemotherapy** // J. Clin. Oncol. — 2007. — Vol. 25. — P. 1247—1254.
13. Saarikoski S. T., Voho A., Reinikainen M. et al. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer // Int. J. Cancer. — 1998. — Vol. 77. — P. 516—521.
14. Siddik Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance // Oncogene. — 2003. — Vol. 22. — P. 7265—7279.

15. *Stoehlmacher J., Park D. J., Zhang W. et al.* Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2002. — Vol. 94. — P. 936—943.

16. *Sweeney C., McClure G. Y., Fares M. Y. et al.* Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-trans-

ferase P1 Ile¹⁰⁵Val polymorphism // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 5621—5627.

Поступила 05.07.2007

*A. A. Moiseyev¹, A. V. Khrunin², E. M. Pavlyushina³, N. A. Pirogova¹,
V. A. Gorbunova¹, S. A. Limborskaya²*

**POLYMORPHISM OF GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE GENES AND
OUTCOMES OF CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER**

¹ *Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC RAMS, Moscow*

² *Molecular Genetics Institute RAS, Moscow*

³ *Chair of Otorhinolaryngology, I. M. Sechenov MMA, Moscow*

Glutathione-S-transferases play a considerable role in activation of many cytostatics including cisplatin. Polymorphism of glutathione-S-transferase encoding genes may have effect on chemotherapy efficacy and toxicity. We studied polymorphism of *GSTP1* (Ile¹⁰⁵Val, Ala¹¹⁴Val), *GSTA1* (–69C/T), *GSTM1* and *GSTT1* (deletions) in 80 women with ovarian cancer receiving cisplatin and cyclophosphamide. *GSTP1* Ile¹⁰⁵Val polymorphism was associated with a shorter time to disease progression: patients with Ile/Ile had a significantly longer progression-free survival as compared to those with Ile/Val or Val/Val genotypes. Median overall survival was not reached in either group though there was a trend in favor of Ile/Ile carriers. Patients with *GSTM1* deletion had a lower risk of clinically significant anemia.

Key words: ovarian cancer, chemotherapy, cisplatin, glutathione-S-transferase.