

М.В.Немцова, Е.В.Ивкин, А.А.Трякин, В.В.Руденко,
И.С.Данцев, С.А.Тюляндин, О.Б.Лоран

Молекулярно-генетические исследования при герминогенных опухолях яичка

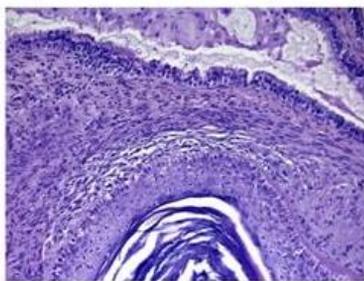
ГОУ ДПО РМАПО Минздрава России
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России
ФГБУ "РОНЦ им.Н.Н.Блохина" Минздрава России
ФГБНУ «Медико-генетический центр»

Актуальность проблемы

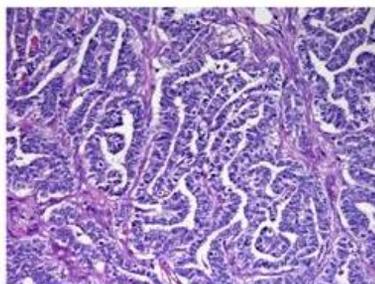
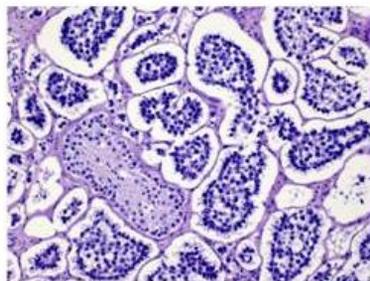
- Герминогенные опухоли яичка (ГОЯ) – относительно редкое заболевание, составляет до 2% ЗНО у мужчин, 5% среди всех опухолей уrogenитального тракта
- Группа риска – молодые мужчины, пик заболеваемости - 25 – 34 года, что определяет социальную значимость
- ГОЯ хорошо поддается лечению, но ранняя диагностика принципиально важна
- Существуют группы пациентов (проблемы сперматогенеза, крипторхизм, микролитиаз, gr-gr делеция локуса AZF), **имеющие повышенный риск развития ГОЯ**

- **Источником герминогенных опухолей яичка являются эмбриональные клетки различной степени дифференцировки**
- **Герминогенные опухоли делят на семиному и несеминозные:**
- **Семиномы** происходят из первичных половых клеток (ППК). Обычно проявляются примерно в возрасте 35 лет.
- **Несеминозные опухоли** чаще всего возникают в возрасте 20-30 лет и состоят из эмбриональных и специализированных клеток на разных ступенях дифференцировки. Различают несколько гистологических типов этих опухолей - **хориокарцинома, опухоль желточного мешка, эмбриональный рак и тератома.**

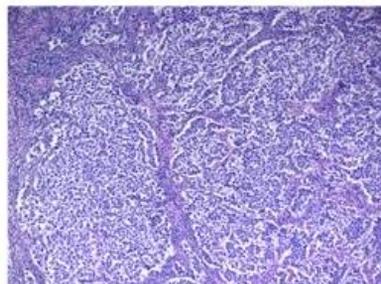
Тератома, плоскоэпителиальная киста и респираторный эпителий (гематоксилин-эозин, об. X20).



Опухоль желточного мешка (гематоксилин-эозин, об. X20)



Эмбриональный рак (гематоксилин-эозин, об. X20)



Типичная семинома (гематоксилин-эозин, об. X10).



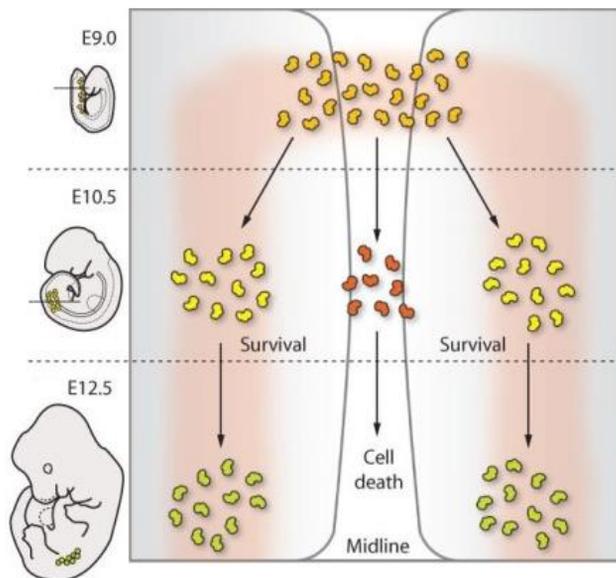
ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ТЕСТИКУЛЯРНОГО РАКА У ОПРЕДЕЛЕННЫХ ГРУПП ПАЦИЕНТОВ

Цель:

- Сформировать комплекс молекулярно-генетических факторов, определяющих повышенный риск развития герминогенных опухолей яичка и разработать методологию их исследования.
- Провести исследование аллелей, определяющих высокий риск развития герминогенных опухолей яичка (ГОЯ) у нормальных фертильных мужчин, пациентов с герминогенными опухолями яичка (семиномы и не семиномы), пациентов с AZF-делецией, пациентов с СТД (крипторхизм, микролитиаз)

Процесс формирования яичек

Миграция ППК в половые валки вдоль срединной линии

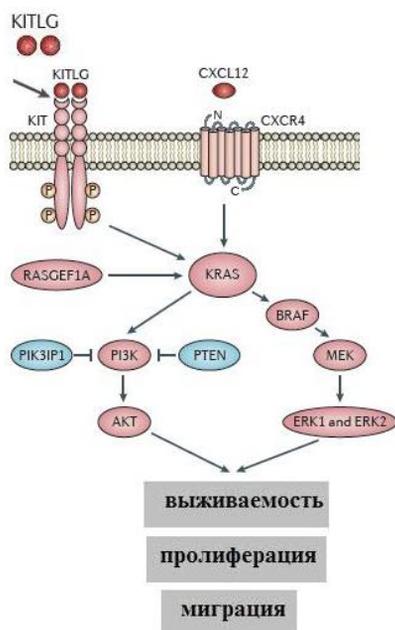


клетки стромы половых валков для нормальной миграции должны экспрессировать КИТ-лиганд (*KITLG*) и *CXCL12*

выживают только мигрировавшие клетки

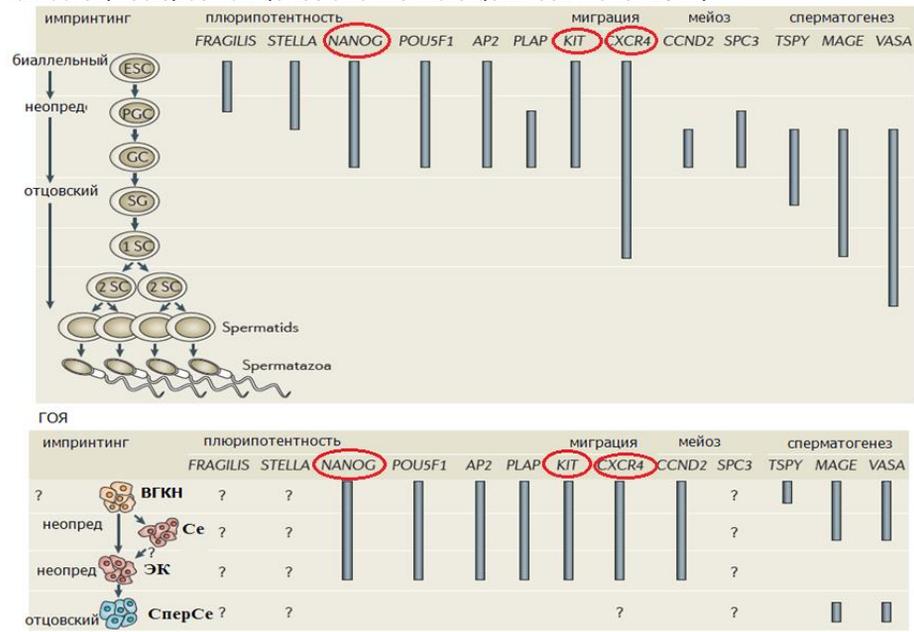
неправильно мигрировавшие клетки подвергаются апоптозу

Роль KITLG-KIT сигналинга в развитии ГОЯ



В районе 12 хромосомы расположены гены, участвующие в патогенезе ГОЯ. Их экспрессия возрастает при увеличении дозы генов, что связано с появлением дополнительного хромосомного материала. Это гены *KITLD*, *KRAS* и циклин D2 (*CCND2*), которые ассоциированы со злокачественной трансформацией и пролиферацией клеток. Также в этом районе расположен кластер генов, связанных с поддержанием стволового потенциала клеток и их плюрипотентных свойств, который включает гены *STELLA*, *NANOG*, *EDR1*, *GDF3*

Этапы формирования мужских половых клеток в норме и гены, регулирующие этот процесс. [Gilbert D., Raple E., Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. 2011]



Канцерогенез ГОЯ



➤ **Изменения ППК в эмбриогенезе в процессе формирования яичка**

➤ **Нарушение миграции и выживание неправильно мигрировавших ППК**

➤ **Сочетание генетических факторов предрасположенности**

➤ **Гиперэкспрессия блока генов, определяющих плюрипотентные свойства**

➤ **Нарушение функции половых клеток после рождения**

➤ **Гормональные нарушения**

➤ **Клинические факторы**

- Крипторхизм
- Микролитиаз яичка
- Атрофия яичка
- Бесплодие, связанное с наличием делеции AZF-c (gr-gr)

➤ **Появление дополнительного материала 12 хромосомы, активация спорадического канцерогенеза**

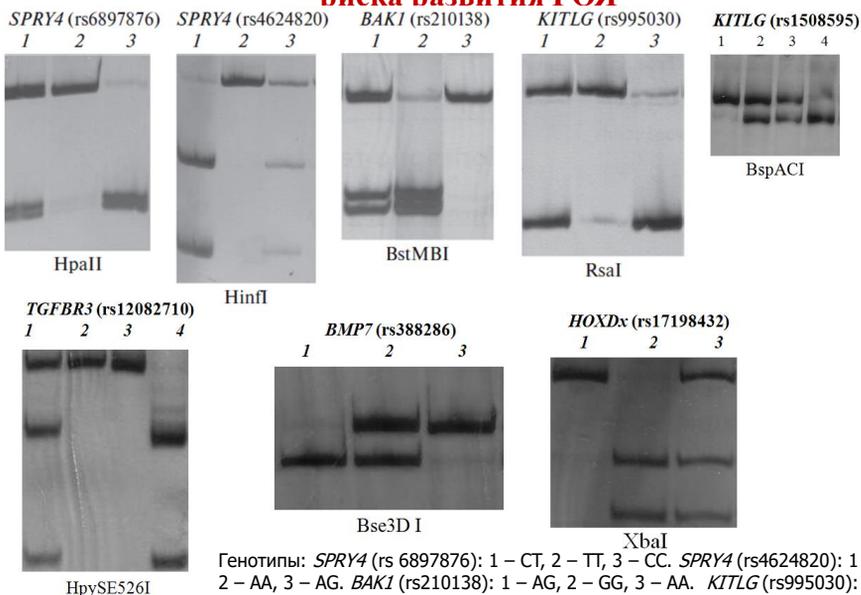


Герминогенные опухоли яичка

Локус	Ген	Функция	Роль в генезе СТД
12q22	<i>KITLG</i>	Ростовой фактор, регулирующий развитие миграцию и выживания ППК	Амплификация или перестройка с последующей активацией в ГОЯ Передача сигнала через KIT, KRAS, MAPK каскады, активация миграции и выживания ППК
5q31.3	<i>SPRY4</i>	Ингибитор KIT-регулируемого сигналинга	Мутации или повреждения в ГОЯ приводят к активации KIT-регулируемого сигналинга
6p21.3	<i>BAK1</i>	Индукция апоптоза	Супрессия KIT-регулируемого сигналинга и апоптоз неправильно мигрировавших клеток
1p33	<i>TGFBR3</i>	Рецептор трансформирующего фактора роста- β (TGF) III типа	Кодирует рецептор, запускающий рост и дифференцировку клеток, как во взрослом организме, так и при эмбриональном развитии, играет большую роль в канцерогенезе
20q13	<i>BMP7</i>	Входит в группу ключевых морфогенетических сигналов, выстраивающих архитектуру ткани по всему организму	Является одной из составных частей TGF β -сигналинга. Участвует в развитии клеток предшественников мужских половых клеток на этапе эмбрионального развития
2q31.1	<i>HOXD</i>	Наряду с <i>HOXA</i> вовлечены в развитие структур мочеполовой системы	Генетические дефекты лежат в основе формирования пороков развития структур мочеполовой системы

Локус	Ген	Функция	Место в генезе СТД
9q33.3	<i>NR5A1</i> (<i>SF1</i> , <i>SRXY3</i>)	Транскрипционный активатор. Имеет важное значение для половой дифференцировки и формирования первичных стероидогенных тканей, регулирует гены ингибирующие АМГ (Гены ингибиторы Мюллеровой субстанции), например такие как <i>АНСН</i> и <i>STARS</i> гены	Нарушения в гене <i>NR5A1</i> могут привести к нарушению половой дифференцировки, крипторхизму, нарушению в синтезе стероидных гормонов
19p13	<i>INSL3</i>	Принимает участие в росте и развитии gubernaculum. Контролирует процесс трансабдоминального опускания яичка	Нарушение экспрессии <i>INSL3</i> приводит к билатеральной интраабдоминальной задержке яичка и недоразвитию gubernaculum и крипторхизму. Отсюда дегенерация сперматогенеза и уменьшение числа сперматозоидов связанная с вакуолизацией клеток Сертоли

Методология ПЦР-ПДРФ для тестирования аллелей высокого риска развития ГОЯ



Аллели и генотипы	Частота аллелей и генотипов (<u>абс. значение</u> частота)		p	OR [CI 95%]
	ГОЯ (n=102)	Контроль (n=97)		
<i>KITLG</i> (rs1508595)				
Аллель А	34/0,167	65/0,335	0,0001 (F)	0,40 [0,25 – 0,64]
Аллель G	170/0,833	129/0,665		2,52 [1,57 – 4,05]
AA	7/0,069	13/0,134		0,48 [0,18 – 1,25]
AG	20/0,196	39/0,402		0,36 [0,19 – 0,68]
GG	75/0,735	45/0,464		3,21 [1,77 – 5,81]
<i>BAK1</i>(rs210138)				
Аллель А	152/0,745	162/0,835	0,03 (F)	0,58 [0,35 – 0,95]
Аллель G	52/0,255	32/0,165		1,73 [1,06 – 2,84]
AA	54/0,529	65/0,670		0,55 [0,31 – 0,98]
AG	44/0,431	32/0,330		1,54 [0,87 – 2,74]
GG	4/0,039	0/0,000		8,91 [0,47 – 167,70]
<i>BMP7</i> (rs388286)				
Аллель С	102/0,500	145/0,747	4.0E-7	0,34 [0,22 – 0,52]
Аллель Т	102/0,500	49/0,253		2,96 [1,94 – 4,52]
CC	24/0,235	51/0,526		0,28 [0,15 – 0,51]
CT	54/0,529	43/0,443		2.0E-7
TT	24/0,235	3/0,031		9,64 [2,80 – 33,22]
<i>TGFBFR3</i> (rs12082710)				
Аллель С	84/0,412	125/0,644	4.0E-6	0,39 [0,26 – 0,58]
Аллель Т	120/0,588	69/0,356		2,59 [1,73 – 3,88]
CC	16/0,157	46/0,474		0,21 [0,11 – 0,40]
CT	52/0,510	33/0,340		2,02 [1,14 – 3,57]
TT	34/0,333	18/0,186		2,19 [1,14 – 4,23]
<i>HOXDx</i> (rs17198432)				
Аллель А	44/0,216	73/0,376	0,0004	0,46 [0,29 – 0,71]
Аллель С	160/0,784	121/0,624		2,19 [1,41 – 3,41]
AA	7/0,069	30/0,309		0,16 [0,07 – 0,40]
AC	30/0,294	13/0,134		2,69 [1,31 – 5,55]
CC	65/0,637	54/0,557		1,40 [0,79 – 2,47]

Частота аллелей и генотипов для <i>KITLG</i> (rs995030, rs1508595), <i>SPRY4</i> (rs4624820, rs 6897876) и <i>BAK1</i> (rs210138) в группе пациентов с несеминомой.				Гены/rs аллели/генотип		Абс. значение/частота		p	OR [95 % CI]
						несеминома (n = 39)	контроль (n = 97)		
<i>KITLG</i> rs995030	A	14/0,18	46/0,237	0,3354	0,7 [0,36 – 1,37]				
	G	64/0,82	148/0,763	(F)	1,42 [0,73 – 2,77]				
	AA	3/0,075	2/0,021	0,0213	3,96 [0,64 – 24,67]				
	AG	8/0,205	42/0,433	(χ ²)	0,34 [0,14 – 0,81]				
	GG	28/0,72	53/0,546		2,11 [0,95 – 4,72]				
rs1508595	A	10/0,13	65/0,335	0,0005	0,29 [0,14 – 0,60]				
	G	68/0,87	129/0,665	(F)	3,43 [1,66 – 7,09]				
	AA	2/0,05	13/0,134	0,0021	0,35 [0,08 – 1,63]				
	AG	6/0,15	39/0,402	(χ ²)	0,27 [0,10 – 0,71]				
	GG	31/0,8	45/0,464		4,48 [1,87 – 10,73]				

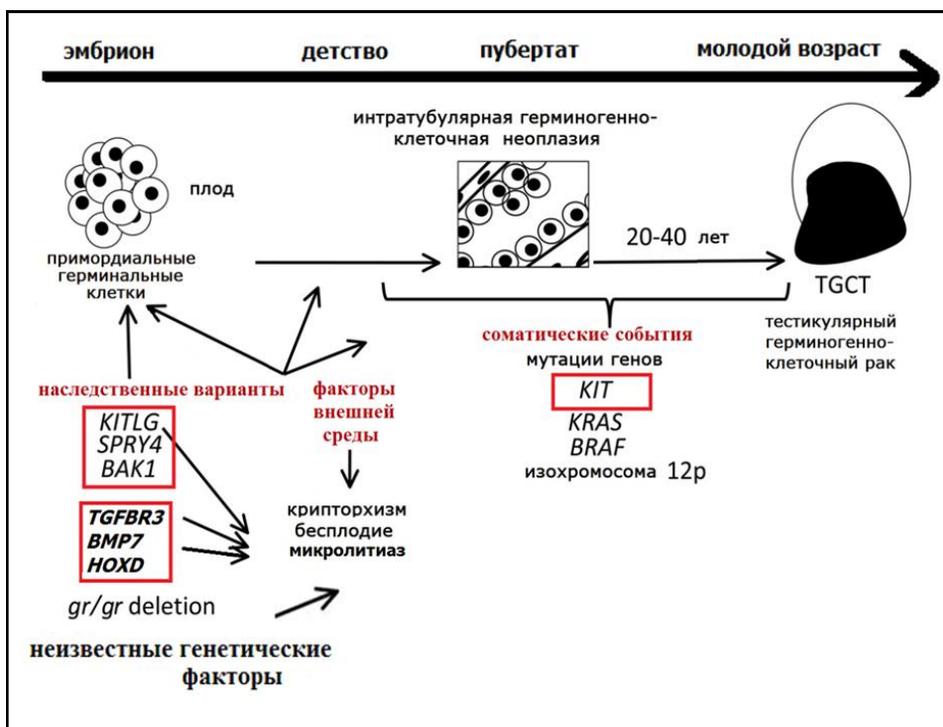
Гены/rs аллели/генотип		Абс. значение/частота		p	OR [95 % CI]
		семинома (n = 34)	контроль (n = 97)		
<i>SPRY4</i> rs4624820	A	48/0,71	106/0,546	0,0226	1,99 [1,10 – 3,61]
	G	20/0,29	88/0,454	(F)	0,50 [0,28 – 0,91]
	AA	18/0,53	28/0,289		2,77 [1,24 – 6,19]
	AG	12/0,35	50/0,515	0,04	0,51 [0,23 – 1,15]
	GG	4/0,12	19/0,196	(χ ²)	0,55 [0,17 – 1,74]
rs6897876	C	46/0,68	110/0,567	0,1175	1,60 [0,89 – 2,86]
	T	22/0,32	84/0,433	(F)	0,63 [0,35 – 1,12]
	CC	16/0,47	32/0,33		1,81 [0,82 – 4,00]
	CT	14/0,41	46/0,474	0,2935	0,78 [0,35 – 1,71]
	TT	4/0,12	19/0,196	(χ ²)	0,55 [0,17 – 1,74]
<i>KITLG</i> rs995030	A	8/0,12	46/0,237	0,0375	0,43 [0,19 – 0,96]
	G	60/0,88	148/0,763	(F)	2,33 [1,04 – 5,23]
	AA	1/0,03	2/0,021		1,44 [0,13 – 16,4]
	AG	6/0,18	42/0,433	0,0282	0,28 [0,11 – 0,74]
	GG	27/0,79	53/0,546	(χ ²)	3,20 [1,27 – 8,05]
rs1508595	A	13/0,19	65/0,335	0,0306	0,47 [0,24 – 0,92]
	G	55/0,81	129/0,665	(F)	2,13 [1,09 – 4,18]
	AA	2/0,06	13/0,134		0,40 [0,09 – 1,89]
	AG	9/0,265	39/0,402	0,0939	0,54 [0,23 – 1,27]
	GG	23/0,68	45/0,464	(χ ²)	2,42 [1,06 – 5,50]
<i>BAK1</i> rs210138	A	48/0,71	162/0,835	0,0329	0,47 [0,25 – 0,90]
	G	20/0,29	32/0,165	(F)	2,11 [1,11 – 4,02]
	AA	15/0,44	65/0,67		0,39 [0,17 – 0,86]
	AG	18/0,53	32/0,33	0,0219	2,29 [1,03 – 5,06]
	GG	1/0,03	0/0,0	(MWT)	8,73 [0,35 – 219,55]

Частота аллелей и генотипов для *KITLG* (rs995030, rs1508595), *SPRY4* (rs4624820, rs 6897876) и *BAK1* (rs210138) в группе пациентов с семиномой.

Распределение частот встречаемости сочетания генотипов высокого риска: AA, CC, GG, GG, AG/GG, для генов *SPRY4*, *KITLG*, *BAK1* в исследуемых группах.

Клинические группы	Сочетание генотипов риска: AA, CC, GG, GG, AG/GG	
	Сочет+	Сочет-
ГОЯ (n = 73)	16/0,22	57/0,78
ГОЯ-семинома (n = 34)	12/0,35	22/0,65
ГОЯ-несеминома (n = 39)	5/0,13	34/0,87
Контроль (n = 97)	4/0,041	93/0,959
p (ГОЯ против К)	0,0005; OR 6,526 [2,078–20,5]	
p (ГОЯ-семинома против К)	< 0,0001; OR 12,68 [3,731–43,11]	
p (ГОЯ-несеминома против К)	0,119; OR 3,419 [0,866–13,49]	
p (ГОЯ-семинома против ГОЯ-несеминома)	0,029; OR 3,709 [1,147–11,99]	

Сочетание генотипов высокого риска в группе ГОЯ достоверно выше чем у фертильных доноров!



Заключение

- Генетические факторы развитие ГОЯ достоверно различаются у больных с семиномой и несеминомой
- Генетические факторы STD достоверно различаются у пациентов с ГОЯ, что подтверждает связь этих клинических состояний
- Генотипирование пациентов с ГОЯ и клинических групп высокого риска может являться дополнительным фактором индивидуального прогноза для пациента
- Комплексное исследование генотипов, ассоциированных с ГОЯ у пациентов из клинических групп, может служить дополнительным критерием при формировании групп риска, их мониторинга и разработки подходов к семейному консультированию и лечению, что является основой предсказательной медицины.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

