

МЕДИЦИНА

УДК 618.11 – 006.6:577.212.04

Е. П. МИХАЛЕНКО¹, С. Е. ШЕЛКОВИЧ², Н. В. ЧЕБОТАРЕВА¹, А. Н. ЩАЮК¹,
Е. Н. МАЙСЕНЯ³, член-корреспондент Ю. Е. ДЕМИДЧИК², Э. В. КРУПНОВА¹

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ АРОМАТАЗЫ У ПАЦИЕНТОК
С СЕРОЗНЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ**

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

E.Michalenko@igc.bas-net.by; n.chebotareva@mail.ru; anyuta_8a@mail.ru; ekrupnova@inbox.ru

²Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

s.shelkovich@mail.ru; yu.demidchik@gmail.com

³Минский городской клинический онкологический диспансер, Минск, Беларусь

an-el@mail.ru

В работе изучена частота распределения полиморфных вариантов гена ароматазы у белорусских пациенток с серозным раком яичников. В данной популяции пациентов установлена связь генетического полиморфизма rs10046 с риском развития серозного рака яичников у женщин старше 50 лет: генотип СТ в группе пациенток встречался достоверно реже (OR = 0,58; 95 % CI: 0,37–0,91; $p = 0,023$).

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ароматаза, эстрогены, серозный рак яичников.

A. P. MIKHALENKA¹, S. E. SHELKOVICH², N. V. CHEBOTAREVA¹, A. N. SCHAYUK¹, E. N. MAISENIA³,
Yu. E. DEMIDCHIK², E. V. KRUPNOVA¹

**GENE POLYMORPHISM OF AROMATASE IN PATIENTS WITH SEROUS OVARIAN CANCER
IN THE REPUBLIC OF BELARUS**

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E.Michalenko@igc.bas-net.by; n.chebotareva@mail.ru; anyuta_8a@mail.ru; ekrupnova@inbox.ru

²Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Minsk, Belarus

s.shelkovich@mail.ru; yu.demidchik@gmail.com

³Minsk City Clinical Oncologic Dispensary, Minsk, Belarus

an-el@mail.ru

The aim of the present research was to study the frequency of the distribution of variants of gene polymorphism of aromatase (CYP19A1) in Belarusian patients with serous ovarian cancer. This population established the influence of gene polymorphism rs10046 with the risk of serous ovarian cancer in women older than 50 years: CT genotype in a group of patients with serous ovarian cancer was met significantly less than in the control group (OR = 0.58; 95 % CI: 0.37–0.91; $p = 0.023$).

Keywords: genetic polymorphism, aromatase, estrogens, serous ovarian cancer.

Введение. Многочисленные исследования показали, что большая часть злокачественных опухолей женской репродуктивной сферы, включая и рак яичников (РЯ), являются гормонозависимыми. Доказано, что необходимым условием запуска процессов трансформации в клетках-мишенях служит увеличение содержания эстрогенов, в большей степени эстрадиола [1].

Эстрон и эстрадиол при помощи реакции ароматизации синтезируются из андростендиона и тестостерона соответственно. Ключевым ферментом этой реакции является ароматаза [2]. В геноме человека имеется одна копия гена ароматазы (CYP19A1), располагающаяся на длинном плече 15 хромосомы. Ген CYP19A1 включает 10 экзонов, девять из которых кодирующие [3]. Ген ароматазы CYP19A1 – высокополиморфный. При этом существуют выраженные межпопуляционные различия в частоте встречаемости полиморфных вариантов гена. Установлено, что неко-

торые полиморфизмы оказывают влияние на уровень гормонов. Уровень эстрогенов в значительной степени связан с двумя полиморфизмами в 3'UTR rs10046 (замена с.1531C>T) и rs4646 (замена с.1673G>T) этого гена. В исследованиях Даннинг и др. [4] впервые показана ассоциация аллеля С полиморфизма rs10046 с низким уровнем эстрогена и эстрадиола, а аллель Т определяет повышенную активность ароматазы [5]. Найман и др. выявили значительное увеличение эстрогена и эстрадиола у лиц с G генотипом полиморфизма rs4646 [6]. Полиморфизмы в 3'UTR расположены на расстоянии 142 п. н. друг от друга и находятся в неравновесном сцеплении.

Наиболее широко изученным является полиморфизм в интроне 4, который представляет собой тандемные повторы участка (TTTA)_n. Более низкое количество повторов (TTTA)_n гена *CYP19A1* ассоциируется с увеличением уровня андрогенов и снижением уровня эстрогенов в крови, и возможно, снижением ферментативной активности ароматазы [7].

Так как злокачественные опухоли яичников в большинстве случаев являются гормонозависимыми, то изучение генетических ферментов метаболизма эстрогенов у пациенток с РЯ позволит установить их вклад в процесс опухолеобразования. Исходя из вышеизложенного, целью работы было изучение частоты распределения полиморфных вариантов *CYP19A1* у белорусских пациенток с серозным РЯ.

Материалы и методы исследования. Целевая группа представлена 200 пациентками с серозным РЯ, которые были обследованы и прошли лечение в Минском городском клиническом онкологическом диспансере с июля 2008 по март 2011 г. Возраст больных варьировал от 18,7 до 83,5 лет, составлял в среднем 58,1 лет. Контрольная группа состояла из 192 женщин без онкопатологии и соответствовала возрасту, наличию сопутствующих заболеваний исследуемой группы. Выделение тотальной ДНК из цельной крови выполняли фенол-хлороформным методом. Были исследованы 3 полиморфизма гена *CYP19A1*: rs10046, rs4646 и (TTTA)_n повторы. Праймеры синтезировались ОДО «Праймтех», Беларусь. Условия ПЦР для каждого из фрагментов были подобраны экспериментально.

Определение полиморфизмов rs10046 и rs4646 осуществлялось методом капиллярного фореза. Терминальную реакцию проводили с использованием коммерческого набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидной последовательности проводилось на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Полученные последовательности ДНК анализировались в программе Sequence Scanner v1.0 (рис. 1).

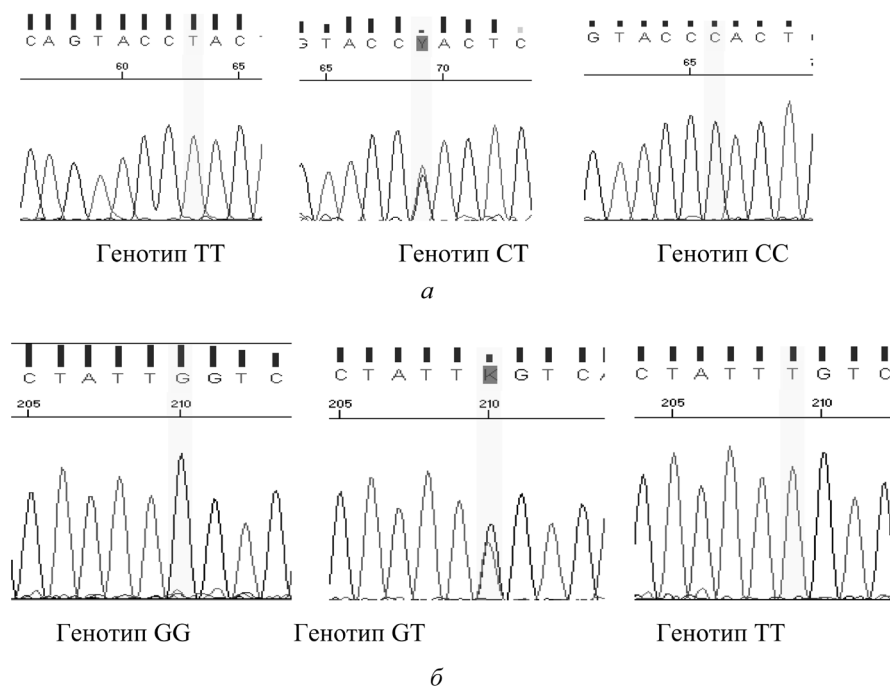


Рис. 1. Фрагмент нуклеотидной последовательности гена *CYP19A1*: а – фрагмент последовательности с полиморфизмом rs10046; б – фрагмент последовательности с полиморфизмом rs4646

Частота распределения полиморфных rs4646 и rs10046 и их комбинаций у исследуемых групп в зависимости от возраста

Генотип	Всего						Моложе 50 лет						Старше 50 лет						
	Пациенты с РЯ, n = 200		Контроль, n = 192		OR (95 % CI)		Пациенты с РЯ, n = 46		Контроль, n = 38		OR (95 % CI)		Пациенты с РЯ, n = 154		Контроль, n = 154		OR (95 % CI)		
	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
rs10046																			
CC	40	20,0	31	16,2	1,29(0,77–2,18)	9	19,6	5	13,2	1,30(0,42–4,04)	31	20,1	26	16,9	1,24 (0,69–2,21)				
CT	92	46,0	107	55,7	0,67(0,45–1,01)	23	50,0	17	44,7	1,23 (0,56–2,92)	69	44,8	90	58,4	0,58 (0,37–0,91)				
TT	68	34,0	54	28,1	1,32(0,86–2,02)	14	30,4	16	42,1	0,67 (0,27–1,66)	54	35,1	38	24,7	1,65 (1,01–2,71)				
rs4646																			
GG	127	63,5	110	57,3	1,29(0,86–1,95)	31	67,4	25	65,8	1,07 (0,43–2,67)	96	62,4	85	55,2	1,34 (0,85–2,12)				
GT	65	32,5	78	40,6	0,70(0,47–1,06)	14	30,4	12	31,6	0,95 (0,37–2,40)	51	33,1	66	42,9	0,66 (0,42–1,05)				
TT	8	4,0	4	2,1	1,36(0,58–6,61)	1	2,2	1	2,6	0,82 (0,05–13,6)	7	4,5	3	1,9	2,40 (0,61–9,45)				
rs10046/rs4646																			
CC/GG	9	4,5	11	5,8	0,77(0,31–1,92)	1	2,2	2	5,3	0,40 (0,03–2,59)	8	5,2	9	5,8	0,88 (0,33–2,35)				
CC/GT	24	12,0	16	8,3	1,50(0,77–2,92)	7	15,2	2	5,3	3,23 (0,63–16,6)	17	11,0	14	9,1	1,24 (0,59–2,62)				
CC/TT	7	3,5	4	2,1	1,71(0,49–5,92)	1	2,2	1	2,6	0,82 (0,05–13,6)	6	3,9	3	1,9	2,04 (0,50–8,31)				
CT/GG	50	25,0	45	23,4	1,08(0,68–1,73)	16	34,8	7	18,4	2,36 (0,85–6,55)	34	22,1	38	24,7	0,86 (0,51–1,47)				
CT/GT	41	20,5	62	32,3	0,54(0,34–0,85)	7	15,2	10	26,3	0,50 (0,17–1,48)	34	22,1	52	33,8	0,55 (0,33–0,92)				
CT/TT	1	0,5	0	0	2,89(0,12–71,5)	0	0	0	0	–	1	0,6	0	0	3,02 (0,12–74,80)				
TT/GG	68	34,0	54	28,1	1,32(0,86–2,02)	14	30,4	16	42,1	0,60 (0,24–1,48)	540	35,1	38	24,7	1,65 (1,01–2,70)				
TT/GT	0	0	0	0	–	0	0	0	0	–	0	0	0	0	–				
TT/TT	0	0	0	0	–	0	0	0	0	–	0	0	0	0	–				

Определение (TTTA)*n* повторов гена *CYP19A1* осуществляли методом фрагментного анализа с помощью набора реактивов (размерный стандарт S 450, HI-DI-formamide) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Анализ результатов проводился в программе GeneMapper. Согласно принятым подходам, tandemные повторы (TTTA)7, (TTTA)8, (TTTA)9 объединяются в группу «короткие фрагменты» – S (short); tandemные повторы (TTTA)10, (TTTA)11, (TTTA)12 объединяются в группу «длинные фрагменты» – L (long). Для валидации результатов фрагментного анализа у 16 (8 %) пациентов было проведено прямое секвенирование исследуемого фрагмента ДНК. Статистическая обработка материала проводилась с использованием программы GraphPad InStat Version 3.05. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к РЯ судили по величине отношения шансов (oddsratio, OR). OR указан с 95 %-ным доверительным интервалом (95 % CI). Для оценки достоверности различий между выборками использовали критерий χ^2 с поправкой Йэкса.

Результаты и их обсуждение. Полиморфизмы rs4646 и rs10046 гена *CYP19A1*, расположенные в 3' нетранслируемой области, связаны с уровнем стероидных гормонов и находятся в неравновесном сцеплении. В таблице представлены результаты анализа данных полиморфизмов у пациенток с РЯ и контрольной группе.

Распределение частот генотипов полиморфизма rs10046 у пациенток РЯ (генотип CC – 20,0 %; генотип CT – 46,0 % и TT – 34,0 %) и полиморфизма rs4646 (генотип GG – 63,5 %; генотип GT – 32,5 % и TT – 4,0 %) статистически не отличалось от распределения частот данных полиморфизмов у женщин без онкопатологии. Анализ комбинаций генотипов этих полиморфизмов показал, что комбинация CT/GT достоверно чаще встречается у женщин без онкопатологии (OR = 0,54; 95 % CI: 0,34–0,853; $p = 0,011$). Полученные результаты указывают на защитную роль гетерозиготных генотипов в риске развития серозного РЯ в данной выборке. Существуют выраженные возрастные различия синтеза эстрогенов у женщин. У женщин с сохраненной менструальной функцией эстрогены в основном продуцируются в яичниках, а у женщин в постменопаузе производство эстрогена яичниками резко снижается и основным источником циркулирующих эстрогенов является преобразование андрогенов в эстрогены в периферических тканях (например, жировая ткань). Заключительный этап этого преобразования катализируется ароматазой [8]. Можно предположить, что роль ароматазы как ключевого фермента преобразования андрогенов в эстрогены, возрастает с увеличением возраста женщины. Мы провели анализ полиморфизмов rs4646 и rs10046 в разных возрастных группах (таблица).

Была выявлена ассоциация полиморфизма rs10046 с риском развития РЯ у женщин старше 50 лет. Генотип CT в группе пациенток встречался достоверно реже по сравнению с контрольной группой (OR = 0,58; 95 % CI: 0,37–0,91; $p = 0,023$), что указывает на защитную роль этого генотипа у женщин старше 50 лет. Анализ комбинаций генотипов полиморфизмов rs10046/rs4646 показал, что комбинация CT/GT достоверно чаще встречается у женщин без онкопатологии (OR = 0,55; 95 % CI: 0,33–0,92; $p = 0,03$).

На следующем этапе мы провели анализ ассоциации полиморфизма в интроне 4 с риском развития РЯ.



Рис. 2. Частота встречаемости аллельных вариантов (TTTA)*n*-полиморфизма в интроне 4 гена *CYP19A1* в исследуемых группах

В нашем исследовании не выявлено различий по частоте встречаемости генотипов (ТТТА) п-полиморфизма у пациенток с РЯ и женщин без онкопатологии. Анализ ассоциации аллельных вариантов данного полиморфизма с риском возникновения РЯ с учетом возраста пациенток также не обнаружил достоверных различий между исследуемыми группами (рис. 2).

(ТТТА)п-полиморфизм широко изучается в отношении риска развития рака молочной железы и эндометрия в популяциях Западной Европы и России. Исследования у пациенток с РЯ ранее не проводились. Российскими исследователями не выявлено связи данного полиморфизма с синдромом поликистоза яичников. Необходимо отметить, что основным ограничением исследований микросателлитного полиморфизма в интроне 4, характеризующегося большим количеством полиморфных вариантов, является статистическая мощность исследуемой выборки.

Заключение. Заболевание женщин злокачественными формами рака репродуктивной системы представляет собой острейшую проблему не только в области медицины, но и социальной сферы. В структуре онкологических заболеваний повышается частота заболеваемости женщин репродуктивного возраста, что является серьезным препятствием на пути реализации государственной программы повышения рождаемости. Одним из подходов для выяснения механизмов развития опухоли является ее молекулярная характеристика. К настоящему моменту мировое сообщество исследователей генетической предрасположенности к возникновению злокачественных опухолей пришло к однозначному выводу о необходимости проведения генетических тестов с целью выявления генетических полиморфизмов, ассоциированных с конкретной онкопатологией.

Таким образом, впервые проведено изучение частоты распределения полиморфных вариантов (ТТТА)п-полиморфизма в интроне 4, rs10046 и rs4646 в 3' нетранслируемой области гена *CYP19A1* у пациенток с серозным раком яичников и женщин без онкопатологии, проживающих на территории Республики Беларусь. В нашем исследовании выявлена защитная роль комбинации СТ/ГТ полиморфизмов rs10046 и rs4646 в 3' нетранслируемой области гена *CYP19A1* в развитии серозного РЯ (OR = 0,54; 95 % CI: 0,34–0,853; $p = 0,011$). В данной популяции пациентов установлена связь генетического полиморфизма rs10046 в 3' нетранслируемой области гена *CYP19A1* с риском развития серозного рака яичников у женщин старше 50 лет: генотип СТ в группе пациенток встречался достоверно реже (OR = 0,58; 95 % CI: 0,37–0,91; $p = 0,023$).

Список использованной литературы

1. Берштейн, Л. М. Гормональный канцерогенез / Л. М. Берштейн. – Санкт-Петербург, 2000. – 199 с.
2. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target / R. J. Santen [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2009. – Vol. 30, N 4. – P. 343–375.
3. Sebastian, S. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project / S. Sebastian, S. E. Bulun // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – Vol. 86, N 10. – P. 4600–4602.
4. Polymorphisms associated with circulating sex hormone levels in postmenopausal women / A. M. Dunning [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2004. – Vol. 96. – P. 936–945.
5. Aromatase gene and osteoporosis: relationship of ten polymorphic loci with bone mineral density / J. A. Riancho [et al.] // *Bone.* – 2005. – Vol. 36. – P. 917–925.
6. Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women / C. A. Haiman [et al.] // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 1893–1897.
7. CYP19 gene: a genetic modifier of polycystic ovary syndrome phenotype / N. Xita [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2010. – Vol. 94, N 1. – P. 250–254.
8. Aromatase expression in women's cancers. Review / S. E. Bulun [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 106. – P. 81–96.

Поступило в редакцию 18.03.2015