© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 618.11-006.6-092:612.6.05]-078.33(571.1/.5)

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ЭСТРОГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ

Н.А. Афанасьева[2, 3], **Е.П. Хвостова**[1], кандидат биологических наук, **В.О. Пустыльняк**[1, 3], кандидат биологических наук, **О.Б. Часовникова**[1], кандидат биологических наук, **С.Э. Красильников**[2, 3], доктор медицинских наук, профессор, **Л.Ф. Гуляева**[1, 3], доктор биологических наук, профессор

[1]ФГБУ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск,

[2]ГБУЗ НСО Новосибирский областной онкологический диспансер,

[3]ФГБОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

E-mail: Gulyaeva@soramn.ru

Ранняя диагностика рака яичников (РЯ) остается актуальной проблемой современной онкологии в связи с высокой смертностью, бессимптомным характером заболевания на ранних стадиях и его агрессивным течением. Целью работы было исследование генетического полиморфизма патогенетически значимых ферментов метаболизма эстрогенов для формирования групп риска развития РЯ.

С помощью метода ПДРФ-ПЦР – полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) был проведен анализ генетического полиморфизма ферментов метаболизма эстрогенов (CYP1A1, CYP1A2, CYP19 и SULT1A1) у 96 больных РЯ. Группу сравнения составили 182 женщины без клинических признаков онкогинекологической патологии. Показано наличие повышенного риска развития РЯ у женщин, имеющих аллель C, генотипы A/C и C/C (ApaI-полиморфизм) гена CYP1A2 (OR=2,9, p<0,001; OR=3,4, p<0,001 и OR=16,4, p<0,001 соответственно), аллель T и генотип C/T (SfaNI-полиморфизм) гена CYP19 (OR=1,98, p=0,043 и OR= 3,9, p=0,001 соответственно), аллель G и генотип G/G (HhaI-полиморфизм) гена SULT1A1 (OR=1,5, p=0,02 и OR=1,9, p=0,04 соответственно). Для гена CYP1A1 (MspI-полиморфизм) таких ассоциаций не обнаружено.

Таким образом, выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов CYP1A2, CYP19 и SULT1A1 у женщин с гормонально-зависимыми опухолями яичников, что может быть использовано в формировании групп риска развития данной патологии для ранней диагностики РЯ.

Ключевые слова: *ферменты метаболизма эстрогенов, полиморфизм генов, рак яичников*

ANALYSIS OF GENETIC POLYMORPHISMS IN ESTROGEN METABOLIZING ENZYMES IN OVARIAN CANCER PATIENTS IN THE SIBERIA REGION

N.A. Afanasyeva[2, 3], E.P. Khvostova[1], V.O. Pustyl'nyak[1, 3], O.B. Chasovnikova[1], S.E. Krasil'nikov[2, 3], L.F. Gulyaeva[1, 3]

[1]Federal State Budgetary Institution «Research Institute for Molecular Biology and Biophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences», Novosibirsk, Russian Federation; [2]Federal State Budgetary Institution of Healthcare «Novosibirsk Regional Cancer Center» of the Novosibirsk region, Novosibirsk, Russian Federation; [3]Federal State budgetary Institution of Higher professional education «Novosibirsk National Research State University», Novosibirsk, Russian Federation

Early diagnosis of ovarian cancer (OC) remains to be the actual problem in modern oncology due to the high mortality rate, asymptomatic course of the disease in the early stages and its aggressiveness. The aim was to study the genetic polymorphism of pathogenetically significant estrogen metabolizing enzymes to form risk groups for developing ovarian cancer.

With the use of PCR-RFLP method genetic polymorphism estrogen metabolizing enzymes metabolism (CYP1A1, CYP1A2, CYP19 and SULT1A1) was analyzed in 96 women with ovarian cancer. As a comparison group 182 women without clinical signs of oncogynecological pathology were selected. Females with the allele C, genotype A/C and C/C (ApaI polymorphism) of the gene CYP1A2 (OR=2,9, p<0,001; OR=3,4, p<0,001 and OR=16,4, p<0,001, respectively), T allele and genotype C/T (SfaNI polymorphism) gene CYP19 (OR=1,98, p=0,043 and OR=3,9, p=0,001, respectively), G allele and genotype G / G (HhaI polymorphism) of the gene SULT1A1 (OR=1,5, p=0,02 and OR=1,9, p=0,04, respectively) were shown to be at increased risk of developing ovarian cancer. For the gene CYP1A1 (MspI polymorphism) no such associations were found. Thus, the associations of polymorphic variants of the genes CYP1A2, CYP19 and SULT1A1 with hormone-dependent tumors of the ovaries in females have been identified. The data obtained can be used in the formation of groups at risk of this disease for early diagnosis of ovarian cancer.

Key words: *estrogen metabolizing enzymes, gene polymorphism, ovarian cancer*

ВВЕДЕНИЕ

Среди злокачественных новообразований женских половых органов рак яичников (РЯ) стабильно занимает 2-е место (после рака шейки матки). По данным Международного агентства по изучению рака, ежегодно в мире регистрируется более 165 тыс. новых случаев РЯ, от которого умирают более 100 тыс. женщин. По официальным данным, в России показатель заболеваемости РЯ (16,5 случая на 100 тыс. женского населения) и смертности (10,0 случая на 100 тыс. женского населения) выше, чем в странах Европейского Союза (14,1 и 8,0 соответственно) [1]. Для Новосибирской области в 2010 г., согласно ежегодному отчету областного онкологического диспансера, показатели заболеваемости РЯ

и смертности от этой патологии составили 15,8 и 10,7 случая на 100 тыс. женского населения. При этом более 25% случаев РЯ выявляются в запущенной (IV) стадии заболевания. В большинстве индустриальных стран РЯ обусловливает наиболее высокие показатели смертности среди всех гинекологических опухолей [5], что прежде всего связано с бессимптомным течением заболевания на ранних стадиях и поздней диагностикой. Так, по сводным данным популяционных раковых регистров стран Европы, годовая выживаемость больных раком яичников составляет 63%, 3-летняя – 41%, 5-летняя – 35%. В связи со сказанным актуальной проблемой остается ранняя диагностика РЯ. Выявление наследственных форм данного заболевания стало важным критерием для формирования групп риска [10]. Одним из значительных достижений в области изучения наследственных форм РЯ и рака молочной железы (РМЖ) явилось открытие генов BRCA1 и BRCA2. По данным Breast Cancer Linkage Consortium (BCLC, 2003), оба гена увеличивают риск развития РМЖ у женщин к 80 годам на 80–85% [4]. По нашим данным, частота встречаемости мутации 5382insC в гене BRCA1 у больных с диагнозом РЯ в Новосибирской области составила 4,1% (в популяции в целом – лишь 0,3% случаев) [2]. Свой вклад в увеличение вероятности развития РЯ могут вносить и низкопенетрантные гены, к которым можно отнести гены, кодирующие ферменты метаболизма эстрогенов [15]. Большинство выявленных факторов риска развития опухолей женской репродуктивной сферы косвенно свидетельствуют о существенной роли гормональных факторов в патогенезе онкологических заболеваний [9]. Известно, что эстрогены образуются из андрогенов в результате сложной цепи биохимических преобразований, ключевую роль в которой играет цитохром P450 19-го семейства (CYP19) [7]. Инактивация эстрогенов осуществляется ферментами I фазы метаболизма – цитохромами P450: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, которые окисляют эстрогены непосредственно в тканях-мишенях до катехолэстрогенов [14]. Дальнейшая деградация катехолэстрогенов протекает с участием ферментов II фазы метаболизма – катехол-О-метилтрансферазы (COMT), глутатион-S-трансферазы (GST) и сульфотрансферазы (SULT) с образованием неактивных и немутагенных продуктов [19].

Научные работы последних лет указывают на то, что полиморфные варианты генов, кодирующих ферменты метаболизма эстрогенов, могут быть ассоциированы с риском возникновения у женщин различных опухолей, особенно гормонально-зависимых [6, 15, 18]. Настоящее исследование посвящено анализу полиморфных вариантов генов CYP1A1, CYP1A2, CYP19 и SULT1A1 у пациенток с диагнозом РЯ и у здоровых женщин, проживающих в Новосибирской области, с целью выявления онкологически значимых факторов риска развития данного заболевания. Полученные данные позволят сформировать группы риска развития РЯ, что сделает возможным выявление заболевания на ранних стадиях и позволит нацеленно проводить профилактическую терапию.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. В работе использовали образцы суспензии клеток буккального эпителия пациенток (96 образцов) Новосибирского областного онкологического диспансера. У всех пациенток был диагноз РЯ; все находились на стационарном лечении в гинекологическом отделении в период с 2005 по 2010 г. Диагноз РЯ был установлен на основании критериев гистологической классификации опухолей яичников ВОЗ. Средний возраст женщин с диагнозом РЯ составил 51±2,2 года. В качестве группы сравнения были выбраны 182 женщины (средний возраст 60,4±1,4 года) без клинических признаков онкогинекологической патологии, которые проходили плановый осмотр в гинекологическом отделении Центральной районной больницы г. Искитима (Новосибирская обл.).

Исследования соответствовали этическим стандартам биоэтического комитета ФГБУ НИИ МББ СО РАМН, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Все участвовавшие в исследовании дали письменное информированное согласие.

Геномную ДНК из буккального эпителия выделяли методом высоко-солевого осаждения белков. Клетки ресуспендировали в 125 мкл буфера, содержащего 0,1 М Трис-HCl (pH 8,0); 0,01 М NaCl и 0,1 М ЭДТА. Добавляли 125 мкл лизирующего буфера, содержащего 0,1 М Трис-HCl (pH 8,0); 0,01 М NaCl; 0,1 М ЭДТА и 1% SDS. Суспензию осторожно перемешивали до полного смешивания и добавляли раствор протеиназы К до конечной концентрации 150 мкг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 55°С в течение 2 ч. После этого в смесь добавляли раствор NaCl до конечной концентрации 1,5 М и перемешивали до полного смешивания. Смесь помещали на лед на 10 мин, затем центрифугировали в течение 15 мин на центрифуге «Eppendorf – 5415D» при 13,2 тыс. об/мин. Супернатант переносили в чистую пробирку Eppendorf, добавив равный объем изопропилового спирта и 10 мкл линейного полиакриламидного геля в качестве соосадителя. Смесь инкубировали при -20°С в течение 1 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 12 тыс. об/мин. Супернатант собирали пипеткой и удаляли. Далее к осадку добавляли охлажденный 70% этиловый спирт, вновь проводили центрифугирование и удаляли супернатант, после чего осадок ДНК подсушивали под тягой при 37°С и растворяли в 50–75 мкл буфера ТЕ (10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА). Концентрацию выделенной ДНК измеряли спектрофотометрически. 2 мкл полу-

ченного раствора ДНК доводили водой до 2 мл в кювете. Измеряли величину поглощения при 260 нм.

Генотипирование образцов ДНК проводили методом ПДРФ-анализа продуктов ПЦР специфических участков генома с использованием праймеров и соответствующих ферментов рестрикции, как описано ранее [16]. Исследовали следующие мутации:

- для *CYP1A1*: замена T264→C в некодирующей 3'-фланкирующей области (*Msp1*-полиморфизм), что сопровождается увеличением активности фермента;
- для *CYP1A2* – замена C→A в позиции гена 734 (*Apa1*-полиморфизм), что сопровождается снижением активности фермента;
- для *CYP19* – замена C→T в 10-м экзоне (*SfaNI*-полиморфизм), при этом повышается термостабильность и активность фермента;
- для *SULT1A1* – замена G638→A (*HhaI*-полиморфизм), что сопровождается снижением активности фермента.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью некоммерческого пакета программ SISA (http://home.clara.net/sisa/). В качестве критерия, определяющего является ли исследуемый признак фактором риска заболевания, использовано отношение шансов (OR). Для оценки достоверности различий (P-p) между выборками использовали критерий χ^2 либо двусторонний точный критерий Фишера.

Таблица 1

ЗНАЧЕНИЯ ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ ДЛЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *CYP1A1* И *CYP1A2*

Полиморфизм	Больные РЯ			Контрольная группа, n
	n*	OR** (95% CI***)	p-values****	
CYP1A1				
T	165			316
C	27	1,4 (0,82–2,32)	0,2	40
T/T	69			148
T/C	27	1,5 (0,82–2,55)	0,2	40
C/C	0	–	1,0	0
всего	96			178
CYP1A2				
A	120			298
C	72	2,9 (1,93–4,30)	**<<0,001**	62
A/A	33			120
A/C	54	3,4 (1,98–5,79)	**<<0,001**	58
C/C	9	16,4 (3,37–79,43)	**<<0,001**	2
всего	96			180

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – количество пробандов выборке; ** – odds ratio, отношение шансов; *** – 95% доверительный интервал; *** – оценка достоверности различий между выборками. Жирным шрифтом выделены достоверно различающиеся величины,

Таблица 2

ЗНАЧЕНИЯ ОТНОШЕНИЯ ШАНСОВ ДЛЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *CYP19* И *SULT1A1*

Полиморфизм	Больные РЯ			Контрольная группа, n
	n*	OR** (95% CI***)	p-values****	
CYP19				
T	174			346
C	18	1,98 (1,00–3,92)	**0,043**	18
T/T	78			168
T/C	18	3,9 (1,71–8,79)	**0,001**	10
C/C	0	–	0,079	4
всего	96			182
SULT1A1				
A	72			173
C	120	1,5 (1,08–2,21)	**0,02**	187
A/A	21			56
A/C	30	1,3 (0,67–2,55)	0,42	61
C/C	45	1,9 (1,01–3,58)	**0,04**	63
всего	96			180

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранняя диагностика РЯ остается главной нерешенной проблемой современной онкогинекологии. Выявление наследственных форм этого заболевания, связанных с мутациями в генах *BRCA1/BRCA2*, а также других генетических маркеров позволяет выделить женщин с высоким риском развития РЯ и делает перспективным проведение скрининговых программ [10, 11, 15]. В большинстве случаев патогенетическим механизмом развития женских онкологических заболеваний являются нарушения в метаболизме половых гормонов, прежде всего, эстрадиола и других эстрогенов [8]. Поэтому целью данной работы было исследование взаимосвязи генетического полиморфизма ферментов, участвующих в метаболизме эстрогенов, с риском возникновения РЯ. Результаты данного исследования представлены в табл. 1 и 2.

При сравнении частоты мутантного аллеля C гена *CYP1A1* и мутантного генотипа T/C среди здоровых и больных РЯ женщин не было выявлено статистически значимых различий (табл. 1). Известно, что цитохром P450 1A1 окисляет эстрогены преимущественно с образованием 4-OH-метаболитов [15]. Можно предположить, что этот этап в метаболизме эстрогенов не является патогенетически значимым для РЯ (по сравнению с нашими данными в отношении рака молочной железы) [13]. Другой фермент, участвующий в окислении эстро-

генов, цитохром P450 1A2, проявляет в основном 2-гидроксиэстрогенмонооксигеназную активность. Мутация C→A в 734 положении от старта транскрипции в его гене приводит к снижению активности фермента [17]. Результаты показали, что у пациенток с диагнозом РЯ наблюдается достоверное увеличение частоты аллеля C (OR=2,9; p<0,001) гена CYP1A2, гетерозиготного генотипа A/C (OR=3,4; p<0,001) и гомозиготного генотипа C/C (OR=16,4; p<0,001) по сравнению с показателями в контрольной группе (см. табл. 1). Следовательно, наличие мутантного аллеля определяет более низкую активность этого фермента, что может приводить к увеличению фонового уровня эстрогенов вследствие медленной скорости их окисления до неактивных продуктов метаболизма и вызывать состояние гиперэстрогенемии, запуская развитие канцерогенеза по ER-опосредованному механизму (промоторный тип).

Цитохром P450 19-го семейства (CYP19), или ароматаза, является ключевым ферментом синтеза эстрогенов из андрогенов, поэтому особый интерес представляет исследование взаимосвязи аллельных вариантов ее гена с риском возникновения рака женских репродуктивных органов [7]. Исследуемый нами полиморфизм для гена *CYP19* представляет собой нуклеотидную замену C→T в 264 кодоне, что оказывает влияние на термостабильность белка и сопровождается увеличением активности фермента [12]. Выявлено достоверное увеличение частоты встречаемости аллеля T (OR=1,98; p=0,043) и гетерозиготного генотипа C/T (OR=3,9; p=0,001) по сравнению с контролем (табл. 2). Эти результаты указывают на гормонально-зависимый механизм возникновения РЯ, где большую роль играет повышенное содержание эстрогенов в тканях-мишенях, в том числе и яичниках. Тогда одной из причин гиперэстрогении может быть генетически детерминированное усиление активности ароматазы.

При исследовании частоты встречаемости полиморфных аллелей и различных генотипов гена *SULT1A1* показано, что у пациенток с РЯ наблюдается достоверное увеличение частоты встречаемости аллеля G (OR=1,5; p=0,02) и гомозиготного генотипа G/G (OR=1,9; p=0,04) по сравнению с таковыми в контрольной группе (см. табл. 2). Сульфотрансфераза SULT1A1 является ферментом 2-й фазы метаболизма ксенобиотиков и катализирует сульфонирование эстрогенов до неактивных сульфометаболитов [3]. Анализируемая нами мутация G638→A приводит к снижению активности фермента [19]. Тогда увеличение частоты встречаемости этой мутации у женщин, больных РЯ, свидетельствует в пользу роли этой ферментативной системы в патогенезе РЯ, когда недостаточная активность SULT1A1 также может привести к гиперэстрогении и, как следствие, развитию гормонально-зависимых форм рака [16, 19, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые исследована частота встречаемости аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты метаболизма эстрогенов и их генотипов у здоровых и больных РЯ женщин Новосибирской области. Показано, что у женщин, имеющих аллель C и генотипы A/C и C/C гена *CYP1A2*, аллель T и генотип C/T гена *CYP19*, аллель G и генотип G/G гена *SULT1A1*, повышен риск развития РЯ.

Таким образом, выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов *CYP1A2, CYP19* и *SULT1A1* с риском развития РЯ, что может быть использовано для формирования групп риска развития данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2007 г. // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2009; 20 (3s): 8–156.
2. Анисименко М.С., Афанасьева Н.А., Часовникова О.Б. и др. Анализ встречаемости мутации 5382insC в гене BRCA1 у больных раком яичников в Сибирском регионе // Сиб. онкол. журн. – 2012; 4 (52): 39–42.
3. Adjei A., Weinshilboum R. Catecholestrogen sulfation: possible role in carcinogenesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002; 292: 402–408.
4. BCLC // Familial Cancer. – 2003; 2 (34): 18–32.
5. Bradford P. Gynecologic Malignancies // Surg. Clin. N. Am. – 2008; 88: 301–17.
6. Bugano D., Conforti-Froes N., Yamaguchi N. et al. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer // Eur. J. Gynaecol. Oncol. – 2008; 29 (4): 313–20.
7. Bulun S., Simpson E. Aromatase expression in women's cancers. Review // Med. Biol. – 2008; 630: 112–32.
8. Cavalieri E., Chakravarti D., Guttenplan J. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention // Biochim. Biophys. Acta. – 2006; 1766: 63–78.
9. Foxa E., Andradeb J., Shupnik M. Novel actions of estrogen to promote proliferation: Integration of cytoplasmic and nuclear pathways // Steroids. – 2009; 74: 622–7.
10. Gevensleben H., Serçe N., Büttner R. Hereditary breast and ovarian cancers // Pathologe. – 2010; 31 (6): 438–44.
11. Goodman M., McDuffie K., Kolonel L. et al. Case-control study of ovarian cancer and polymorphisms in genes involved in catecholestrogen formation and metabolism. // Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev. – 2001; 10: 209–16.
12. Kagava N., Hori H., Waterman M. et al. Characterization of stable human aromatase expressed in E. coli // Steroids. – 2004; 69 (2): 235–43.
13. Khvostova E., Pustylnyak V., Gulyaeva L. Genetic polymorphism of estrogen metabolizing enzymes in Siberian women with breast cancer // Genet. Test. Mol. Biomarkers. – 2012; 16 (3): 167–73.
14. Lee A., Cai M., Thomas P. et al. Characterization of the oxidative metabolites of 17β-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms // Endocrinol. – 2003; 144: 3382–98.
15. Low Y., Li Y., Humphreys K. et al. Multi-variant pathway association analysis reveals the importance of genetic determinants of estrogen metabolism in breast and endometrial cancer // PLOS Genet. – 2010; 6 (7): E1001012 doi: 10.1371.
16. Mikhailova O., Gulyaeva L., Prudnikov A. et al. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms in the assessment of female hormone-dependent cancer risk // Pharmacogenomics J. – 2006; 6 (2): 189–93.
17. Sachse C., Bhambra U., Smith G. et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2003; 55: 68–76.
18. Tworoger S., Chubak J., Aiello E. et al. Association of CYP17, CYP19, CYP1B1 and COMT polymorphisms with serum and urinary sex hormone concentration in postmenopausal women // Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. – 2004; 13: 94–101.
19. Xu Y., Liu X., Guo F. at al. Effect of estrogen sulfation by SULT1E1 and PAPSS on the development of estrogen-dependent cancers // Cancer Sci. – 2012; Mar 1. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02258.x.
20. Cavalieri E., Chakravarti D., Guttenplan J. Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention // Biochim. Biophys. Acta. – 2006; 1766: 63–78.