

Ж.Т. Исакова¹, В.Н. Купень², К.А. Айтбаев¹, М.А. Юсуфова³, Д.В. Винников^{1,4},
Н.М. Букуев⁵, Б.Б. Султангазиева⁵, Н.М. Алдашева^{1,3}

Вклад полиморфизма генов семейства глутатионтрансфераз *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* в формирование предрасположенности к раку молочной железы у женщин кыргызской национальности

¹НИИ молекулярной биологии и медицины, Бишкек, Кыргызская Республика
г. Бишкек,

²Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск,

³Кыргызско-Российский Славянский Университет, Бишкек, Кыргызская Республика, г. Бишкек,

⁴Казахский национальный университет имени Аль-Фараби, Алматы, Казахстан,

⁵Национальный центр онкологии и гематологии, Бишкек, Кыргызская Республика, Бишкек

Цель: Оценить вклад полиморфизма генов семейства глутатионтрансфераз (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*), а также их межгенные взаимодействия в формирование предрасположенности к раку молочной железы (РМЖ) у женщин кыргызской национальности.

Материалы и методы. В исследование были включены 87 женщин с гистологически верифицированным диагнозом РМЖ и 96 женщин без онкопатологии в индивидуальном анамнезе. Генотипирование по полиморфным локусам проводили с использованием методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДФ) и аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР). Межгенные взаимодействия оценивали с использованием программы MDR 3.0.2.

Результаты. Среди женщин кыргызской национальности делеция участка гена *GSTM1* является генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития РМЖ (ОШ=2,18, 95% ДИ 1,38-3,44), $p=0,0007$), тогда как отсутствие делеции в данном гене напротив, ассоциировано с протективным эффектом. Анализ полиморфных маркеров *null* (*GSTT1*) и *p.Ile105Val* (*GSTP1*) не выявил статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей между больными РМЖ и женщинами из группы сравнения ($p>0,05$). Анализ межгенных взаимодействий с использованием MDR-анализа показал, что при одновременном наличии генотипов Arg/Gln (ген *XRCC1*) и *null* (ген *GSTM1*) вероятность развития РМЖ составила — ОШ=2,63.

Заключение. Делеция участка гена *GSTM1*, а также сочетанное носительство генотипов Arg/Gln (ген *XRCC1*) и *null* (ген *GSTM1*) ассоциированы с повышенной вероятностью развития РМЖ у женщин кыргызской национальности.

Ключевые слова: рак молочной железы, полиморфизм, гены, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, кыргызская популяция, межгенные взаимодействия, MDR-анализ

Введение

Сегодня молекулярная медицина вступила в такую фазу своего развития, что можно говорить о наступлении эры персонифицированной медицины. В корне меняются медицинские подходы к диагностике и лечению. Вопрос традиционной медицины «Чем вы болеете?» заменяется новым — «Чем вы можете заболеть при вашем геноме?» В этой связи, молекулярно-генетические подходы к диагностике, терапии и профилактике заболеваний являются актуальными.

Рак молочной железы (РМЖ) продолжает оставаться одним из самых распространенных видов онкологических заболеваний у женщин. Число женщин, заболевших РМЖ в мире, ежегодно увеличивается [1]. В Кыргызстане также наблюдается стойкий рост и омоложение заболеваемости, причём у большинства женщин РМЖ диагностируется в поздней (III-IV) стадии, когда лечение становится затратным и малоэффективным [2].

Загрязнение атмосферного воздуха (на улице) и бытовое загрязнение воздуха (в помещении), хронический стресс, курение, высокая инфицированность населения онковирусами являются провоцирующими факторами для развития онкологических заболеваний. При провоцирующем действии факторов внешней среды злокачественные новообразования гораздо чаще возникают у лиц с наследственной предрасположенностью [3].

Для РМЖ характерен свой специфический набор генов предрасположенности, но в то же время не известно, взаимодействием скольких генов определяется развитие данной онкопато-

логии. С использованием метода полногеномного поиска ассоциаций (англ. Genome-Wide Association Studies, GWAS) уже идентифицировано более 90 генов-кандидатов РМЖ [4]. Среди генов, для которых наличие конкретного генотипа/аллеля ассоциировано с повышенным риском развития РМЖ, особое место занимают гены семейства глутатионтрансфераз *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*. Ферменты метаболизма ксенобиотиков (ФМК), которые кодируются данными генами, составляют основу II фазы детоксикации ксенобиотиков. Они задействованы в инактивации метаболитов I фазы, катализируя их связывание с кофакторами, которые превращают их в гидрофильные формы, что облегчает выведение этих метаболитов [5].

Глутатионтрансферазы (GST, Glutathione S-transferase) катализируют взаимодействие глутамата с электрофильными атомами (C, N, S, O) широкого спектра соединений. Функционально GST отвечают за ферментную конъюгацию сульфгидрильной ($-SH_2$) группы с органическими электрофильными молекулами ксенобиотиков. GST катализирует реакцию глутамата с различными алифатическими, ароматическими, эпоксидными и гетероциклическими радикалами экзогенных повреждающих веществ. В зависимости от типа субстрата в семействе GST выделяют четыре класса: альфа (α), мю (μ), пи (π) и тета (θ). Глутатион-опосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении резистентности клеток к перекисному окислению жиров, свободным радикалам, алкилированию белков и др.

Ген *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1, NCBI Gene ID — 2944), локализованный на хромосоме 1, существует в трех вариантах. Два из них — *GSTM1a* и *GSTM1b*, — кодируют белки, несколько различающиеся по своей ферментативной активности. При третьем варианте (*GSTM1* null), вследствие наличия протяженной (около 10 тыс п.о.) делеции, белковые продукты вообще не синтезируются. Удивительным и пока малопонятным является факт чрезвычайно широкого распространения в человеческих популяциях именно нулевой аллели *GSTM1*. Установлено, что в большинстве групп мирового народонаселения ее частота может достигать 55% и выше [6]. По данным Баранова В.С., пропорция людей, гомозиготных по нулевой аллели, т.е. практически лишенных одного из семейств GST, составляет 35-50% [7].

Ген *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1, NCBI Gene ID — 2950) локализован на хромосоме 11 (11.q13), белковый продукт которого относится к особенно важным изоформам GST. Установлено, что в зависимости от генотипа по

полиморфизму p.Ile105Val (rs1695) гена *GSTP1* может наблюдаться почти семикратное изменение каталитической активности фермента по отношению к полициклическим ароматическим соединениям [8].

Ген *GSTT1* (glutathione S-transferase theta 1, NCBI Gene ID — 2952) картирован на хромосоме 22. Как и в случае *GSTM1*, благодаря высокой частоте распространенности обширной делеции в структурной части гена, 15-30% европеоидов оказываются гомозиготными по нулевой аллели *GSTT1*. У таких индивидуумов зарегистрирована повышенная предрасположенность к развитию различного рода неоплазий [7].

Принято считать, что полиморфизм глутатионтрансфераз — *GSTM1* null, rs1695 (*GSTP1*) и *GSTT1* null, — может иметь отношение к восприимчивости человека к различным заболеваниям, в том числе к различным нозологическим формам рака [9,10]. Функциональные полиморфизмы генов ФМК могут быть связаны с равновесием промежуточных метаболитов, образующихся в процессе биотрансформации. Некоторые из последних могут индуцировать структурные изменения в ДНК. Индивидуальные различия в этих и других компонентах человеческого генома, связанные с воздействием внешнесредовых факторов, могут видоизменять риск развития экологически обусловленных заболеваний.

Сочетанное носительство отдельных вариантов генов *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* также может обуславливать индивидуальные особенности предрасположенности к развитию РМЖ.

Таким образом, для РМЖ, как и других болезней с наследственной предрасположенностью, существует свой специфический набор генов-кандидатов, взаимодействием которых, в основном, и определяется развитие неопластического процесса. Следовательно, идентификация их, т.е. генетических предикторов предрасположенности к РМЖ, является важным прогностическим фактором, так как позволяет сформировать группы лиц высокого риска развития онкологических заболеваний, что даёт возможность своевременно, на самом раннем этапе, провести комплекс профилактических мероприятий. Своевременно проведенная пациент-ориентированная профилактика, в свою очередь, будет способствовать снижению частоты распространённости РМЖ, повышению качества и продолжительности активной жизни населения.

Цель исследования: охарактеризовать межгенные взаимодействия и вклад полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* в формирование предрасположенности к раку молочной железы у женщин кыргызской национальности.

Материалы и методы

Исследование проведено по типу случай-контроль и включает 183 женщины кыргызской национальности, из которых 87 — женщины с гистологически верифицированным диагнозом РМЖ (основная группа), 96 — женщины без онкопатологии в индивидуальном анамнезе (группа сравнения). Средний возраст женщин с РМЖ составил 50,2±17,8 лет, в группе сравнения — 45,9±8,8 лет.

После разъяснительной беседы и добровольного согласия в письменной форме всех обследуемых пациентов сделан забор 5 мл венозной крови для проведения молекулярно-генетических исследований. ДНК выделяли стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции. Делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* анализировали с использованием аллель-специфической ПЦР в реальном времени, как описано в работе Смирновой Е.Г. и др. [11].

Идентификацию генотипа для однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) p.I105V гена *GSTP1* проводили методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с использованием эндонуклеазы рестрикции *TaiI* (ThermoFisher, США). ПЦР-смесь готовили в объеме 25 мкл: 2,5 мкл 10x буфера, содержащего (NH₄)₂SO₄, 2,5 мкл 10x смеси dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, по 5 пмоль прямого и обратного праймеров, 0,01 ед. *Taq*-полимеразы и 1 мкл ДНК исследуемых образцов (10-50 нг/мкл).

Краткая характеристика исследованных полиморфизмов представлена в табл. 1.

Информация о последовательностях олигонуклеотидов для анализируемых полиморфизмов, а также об используемой эндонуклеазе рестрикции представлены в табл. 2.

Результаты электрофоретического разделения ампликонов или продуктов реакции рестрикции для исследуемых полиморфизмов представлены на рис. 1.

Для нахождения различий между номинальными показателями использовали метод χ -квадрат. Уровень статистической значимости p при множественных сравнениях вычислялся экспериментально для каждого конкретного случая (сравнения) в процессе моделирования в пакете SPSS v.20.0. Использовали точный критерий Фишера, основанный на пермутации (англ. permutation) — уровень p вычисляется по формулам комбинаторной теории вероятностей. Анализ ассоциации генотипов с риском развития заболевания проводился путем вычисления показателя отношения шансов (ОШ) для каждого анализируемого полиморфизма (с расчетом 95% ДИ). Статистическая обработка

данных проводилась с использованием SPSS v.20.0 (IBM, США).

Анализ межгенных взаимодействий проводился биоинформатическим методом многофакторного сокращения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) с использованием размещенного в открытом доступе (англ. open-source software) ПО MDR v.3.0.2. (<http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>). В процессе моделирования были использованы высоко консервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие/отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (attribute count range) — от 1 до n (где n — количество переменных в модели); воспроизводимость модели (cross-validation count) — 100; анализ топ-моделей (track top models) — 1000; поиск конфигурации модели (search method configuration) — всесторонний (exhaustive); метод сравнения (ambiguous cell analysis) — точный тест Фишера (Fisher's exact test); классификация ячеек (ambiguous cell assignment) — неклассифицированные (unclassified). Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими атрибутами.

Результаты

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфизмам генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* у женщин с РМЖ и в группе сравнения

Нами изучено распределение аллелей для трех полиморфизмов в генах: *GSTM1* (null), *GSTP1* (p.I105Val), *GSTT1* (null), — у женщин с РМЖ и в группе сравнения (табл. 3).

В группе сравнения распределение генотипов по всем проанализированным вариантам соответствовало ожидаемому распределению Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Анализ полиморфизма null гена *GSTM1* выявил статистически значимые различия в распределении частот аллелей между пациентами

Таблица 1. Краткая характеристика исследованных полиморфизмов

Ген	Хромосомная локализация гена*	Аминокислотная замена / делеция (null)
GSTM1	Chr.1 (NC_000001.11):109,687,201 — 109,694,340	null
GSTP1	Chr.11 (NC_000011.10):67,583,289 — 67,586,959	p.I105Val
GSTT1	Chr.22 (NT_187633.1):269,490 — 279,304	null

*GRCh38.p13 (GCF_000001405.39)

Таблица 2. Структура праймеров для амплификации фрагментов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*

Полиморфизм (ген)	Последовательность олигонуклеотида 5'>3'	Эндонуклеаза рестрикции	Ссылка
null (<i>GSTM1</i>)	F: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' R: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	-	[11]
p.I105Val (<i>GSTP1</i>)	F: 5'-TATGGGAAGGACCAGCAGGA-3' R: 5'-CAAGCCACCTGAGGGGTAAG-3'	TaiI (HpyCH4IV)	Данное исследование
null (<i>GSTT1</i>)	F: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' R: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGC-3'	-	[11]

с РМЖ и женщинами из группы сравнения ($\chi^2=11,47$, $p=0,0007$) (табл. 3). В группе больных РМЖ наблюдалось достоверное увеличение частоты делеционного полиморфизма по отношению к группе сравнения (36,5% и 20,8% соответственно). Таким образом, у женщин кыргызской национальности делеция участка гена *GSTM1* является генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью

развития РМЖ (ОШ=2,18, 95% ДИ 1,38-3,44, $p=0,0007$), тогда как отсутствие протяженной делеции в данном гене напротив, ассоциировано с протективным эффектом.

Анализ полиморфизмов null (ген *GSTT1*) и p.Ile105Val (*GSTP1*) не выявил статистически значимых различий в распределении частот генотипов или аллелей между больными РМЖ и женщинами из группы сравнения ($p>0,05$).

Таблица 3. Результаты генотипирования по исследуемым полиморфизмам генов глутатионтрансфераз в группе больных с РМЖ (87 чел.) и практически здоровых женщин кыргызской национальности (96 чел.)

Полиморфизм (ген)	Генотип /аллель	Больные РМЖ, % (абс)	Группа сравнения, % (абс)	p	ОШ (95% ДИ)
null (<i>GSTM1</i>)	deletion	36,5% (35)	20,8% (20)	<0,001	2,18 (1,38-3,44)
	no deletion	63,5% (61)	79,2% (76)		0,46 (0,29-0,72)
p.Ile105Val (<i>GSTP1</i>)	Ile/Ile	64,4% (56)	67,7% (65)	0,840	0,86 (0,47-1,59)
	Ile/Val	29,9% (26)	28,1% (27)		1,09 (0,57-2,06)
	Val/Val	5,7% (5)	4,2% (4)		1,40 (0,36-5,40)
	Ile/Ile	64,4% (56)	67,7% (65)	0,631	0,86 (0,47-1,59)
	Ile/Val // Val/Val	35,6% (31)	32,3% (31)		1,16 (0,63-2,14)
	Ile/Ile // Ile/Val	94,3% (82)	95,8% (92)	0,622	0,71 (0,19-2,75)
	Val/Val	5,7% (5)	4,2% (4)		1,40 (0,36-5,40)
null (<i>GSTT1</i>)	deletion	21,8% (19)	30,2% (29)	0,072	0,65 (0,40-1,04)
	no deletion	78,2% (68)	69,8% (67)		1,55 (0,96-2,49)

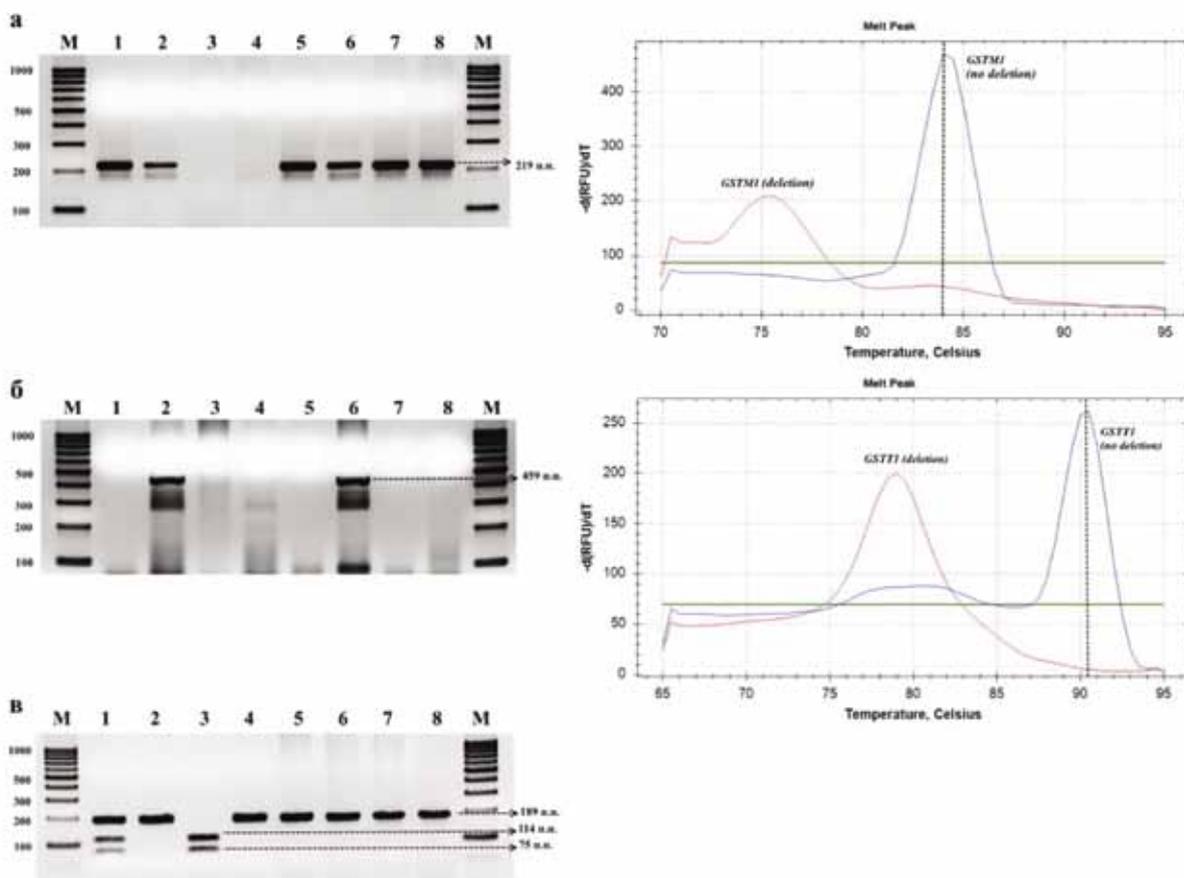


Рис. 1. Электрофореграммы и профиль плавления ампликонов: а. — null (ген *GSTM1*): №№ 1, 2, 5-8 — делеция отсутствует, №№ 3, 4 — делеция; б — null (ген *GSTT1*): №№ 1, 3-5, 7, 8 — делеция, №№ 2, 6 — делеция отсутствует; в — ОНП p.Ile105Val (ген *GSTP1*) — №№ 2, 4-8 — генотип AA, № 1 — AG, № 3 — GG; М — маркер молекулярного веса (Jena Bioscience M-214S)

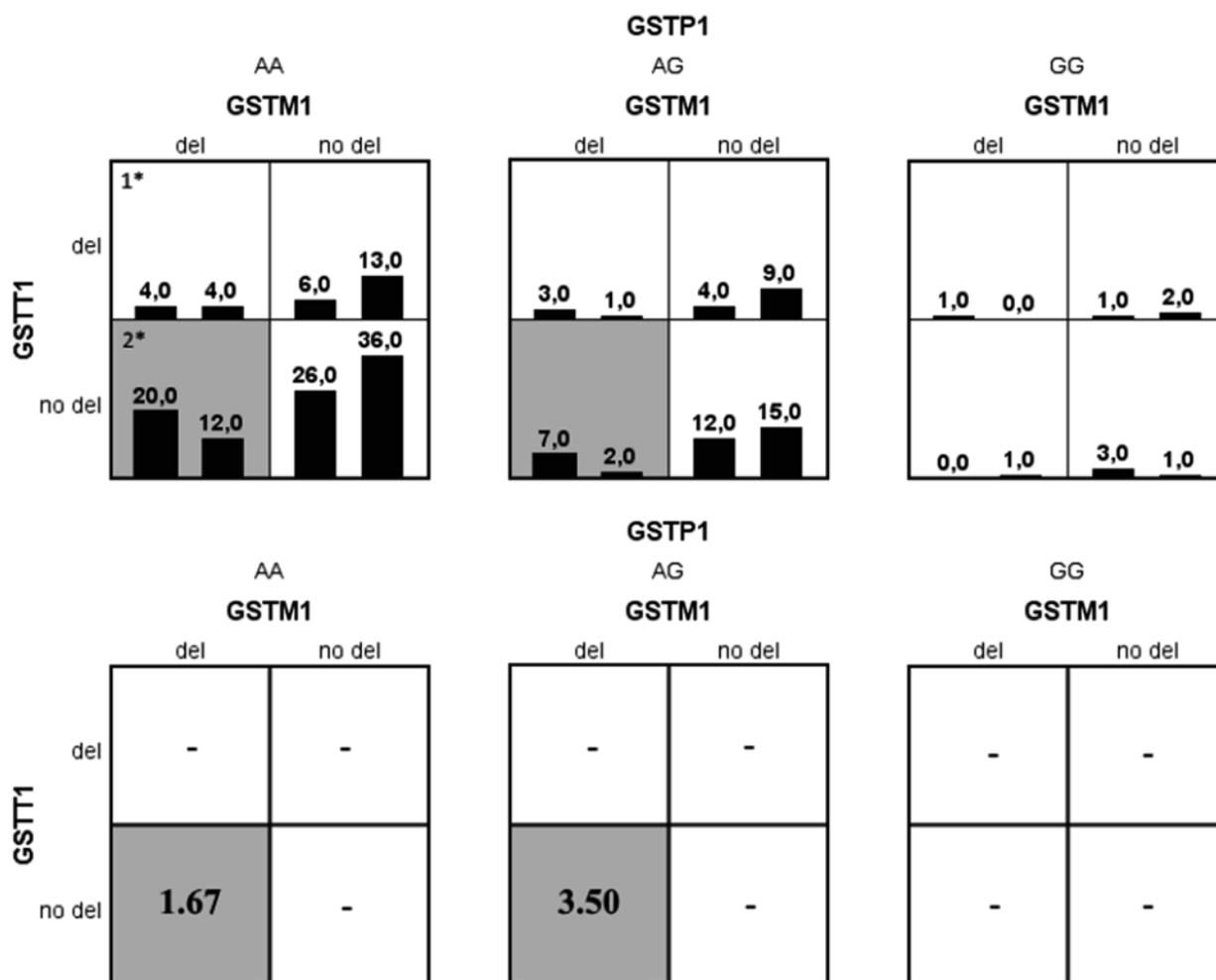
Межгенные взаимодействия полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* при раке молочной железы

При оценке сочетанного носительства вариантов генов *GSTM1* (null), *GSTP1* (p.Ile105Val) и *GSTT1* (null) были выявлены генотипы, статистически значимо ассоциированные с повышенной вероятностью развития РМЖ. Наиболее значимые парные комбинации, ассоциированные с РМЖ, представлены на рис. 2.

Так, частота встречаемости следующих сочетаний генотипов была статистически значимо выше у пациентов с РМЖ, чем среди женщин из группы сравнения: no del (*GSTT1*) // del (*GSTM1*) // AA/AG (*GSTP1*).

Как показывают результаты, среди парных комбинаций, ассоциированных с повышенной вероятностью развития РМЖ, преобладали комбинации, включающие делеционный вариант гена *GSTM1*. Таким образом, у женщин, имеющих генотип null (*GSTM1*), вероятность развития РМЖ возрастала не менее чем в 1,67-3,50 раза.

В аналогичных исследованиях А.М. Бурденного и др. изучена ассоциация нулевых аллелей генов *GSTM1*, *GSTT1* и ОНП p.I105V гена *GSTP1* с риском развития РМЖ и его гистологических подтипов у женщин Московского региона, РФ [12]. Показано, что имеется ассоциация нулевых генотипов генов *GSTT1* и *GSTM1*, а также генотипов Ile/Val и Val/Val гена *GSTP1* с риском развития РМЖ (ОШ равны 1,89, 1,65, 1,47 и 1,33 соответственно). Кроме того, обнаружена высокодостоверная ассоциация нулевого генотипа гена *GSTT1* и генотипов Ile/Val и Val/Val гена *GSTP1* с риском развития РМЖ у пациенток моложе 53 лет (ОШ равны соответственно 2,33 и 2,31), а также ассоциация сочетания нулевых генотипов генов *GSTT1* и *GSTM1* с высоким риском развития РМЖ (ОШ=3,18). Максимальный риск развития РМЖ был отмечен в случае сочетанного носительства нулевых генотипов генов *GSTT1* и *GSTM1* и генотипа Val/Val по полиморфизму p.I105V гена *GSTP1* (ОШ=16,42).



1* (белый цвет) — различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы
2* (темно-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с высокой вероятностью развития РМЖ (риск-ассоциированный эффект)

Рис. 2. Комбинации генотипов в рамках моделирования эффекта межгенных взаимодействий для полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* (показаны рассчитанные значения ОШ)

А. Saxena et al. на выборке из 413 пациентов с РМЖ из Северной Индии показали, что наличие нулевого генотипа по гену *GSTM1*, а также генотипа Val/Val по ОНП p.I105V гена *GSTP1* способно значительно повысить риск развития РМЖ: ОШ= 2,28, 95% ДИ=[1,65-2,97] и ОШ= 2,59, 95% ДИ=[1,67-4,39] соответственно [13]. Тем не менее, авторы не обнаружили никакой связи между наличием нулевого генотипа по *GSTT1* и общим риском развития РМЖ: ОШ=1,04, 95% ДИ=[0,76-1,59]. Одновременное наличие генотипов Ile/Ile или Ile/Val (p.I105V, ген *GSTP1*) и нулевых генотипов по *GSTM1* и *GSTT1* приводило к более чем четырехкратному увеличению риска развития РМЖ: ОШ=4,02, 95% ДИ=[1,99-8,51].

Таким образом, как было отмечено ранее, для пациентов с РМЖ из Кыргызстана имеются особенности по наличию сочетанного носительства вариантов генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*, ассоциированных с повышенной вероятностью развития РМЖ.

С использованием программы MDR 3.0.2 проведено моделирование межгенных взаимодействий полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, отражающее вклад полиморфизма каждого гена в вероятность развития РМЖ (выраженный в процентах) (рис. 3).

Как видно на радиальной диаграмме (рис. 3), среди трех исследованных полиморфизмов, наибольший вклад в увеличение вероятности возникновения РМЖ вносит делеционный полиморфизм гена *GSTM1*. Показатель энтропии для данного полиморфизма составил 3,24%. Показатели энтропии по генам *GSTT1* (null) и *GSTP1* (p.Ile105Val) были значительно меньше и составили 0,66% и 0,14% соответственно.

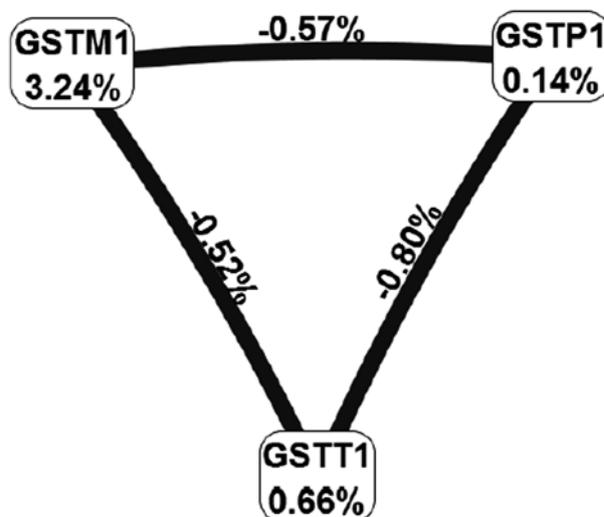


Рис. 3. Графическое изображение результатов анализа взаимодействий между полиморфизмами генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* у женщин кыргызской национальности при наличии РМЖ

Также с использованием программы MDR v.3.0.2 нами была построена модель, отражающая характер взаимодействия анализируемых в рамках данной работы полиморфизмов при РМЖ, связанный, в свою очередь, с хромосомной локализацией полиморфизма (рис. 4). В результате моделирования было выделено 2 кластера: 1. null (ген *GSTM1*); 2. p.Ile105Val (ген *GSTP1*) и null (ген *GSTT1*).

Полученные данные свидетельствуют о том, что в отношении всех трех пар вариантов — null (ген *GSTM1*), p.Ile105Val (ген *GSTP1*) и null (ген *GSTT1*), — имеются взаимодействия выраженного дублирующего характера (линии черного цвета); в то же время межгенные связи, характеризующиеся длиной связи, для данных полиморфизмов выражены слабо.

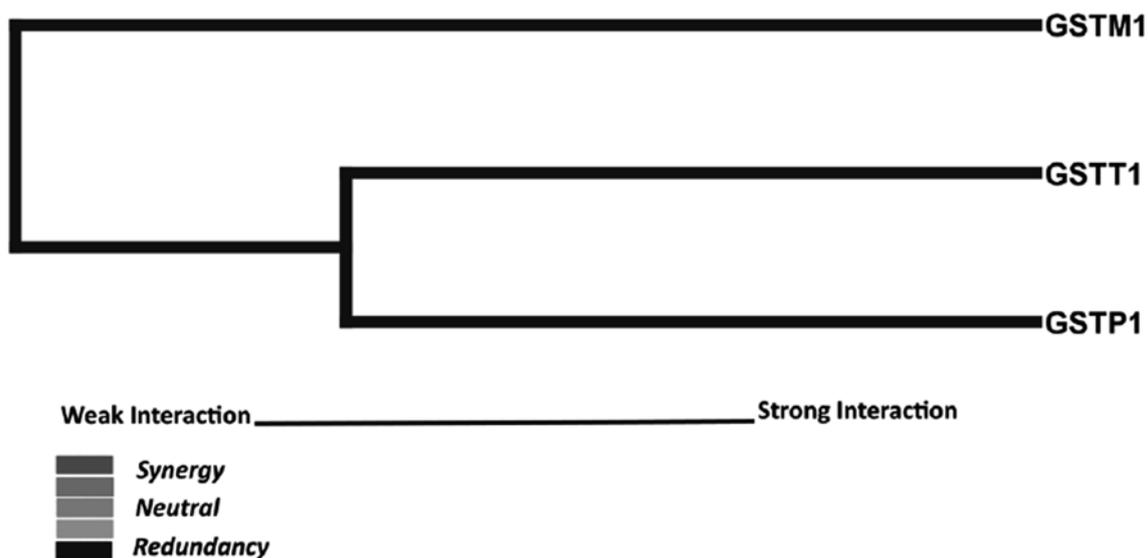


Рис. 4. Оценка дистанции связи (эффекта межгенного взаимодействия) между исследуемыми полиморфизмами null (ген *GSTM1*), p.Ile105Val (ген *GSTP1*) и null (ген *GSTT1*) для пациентов с РМЖ

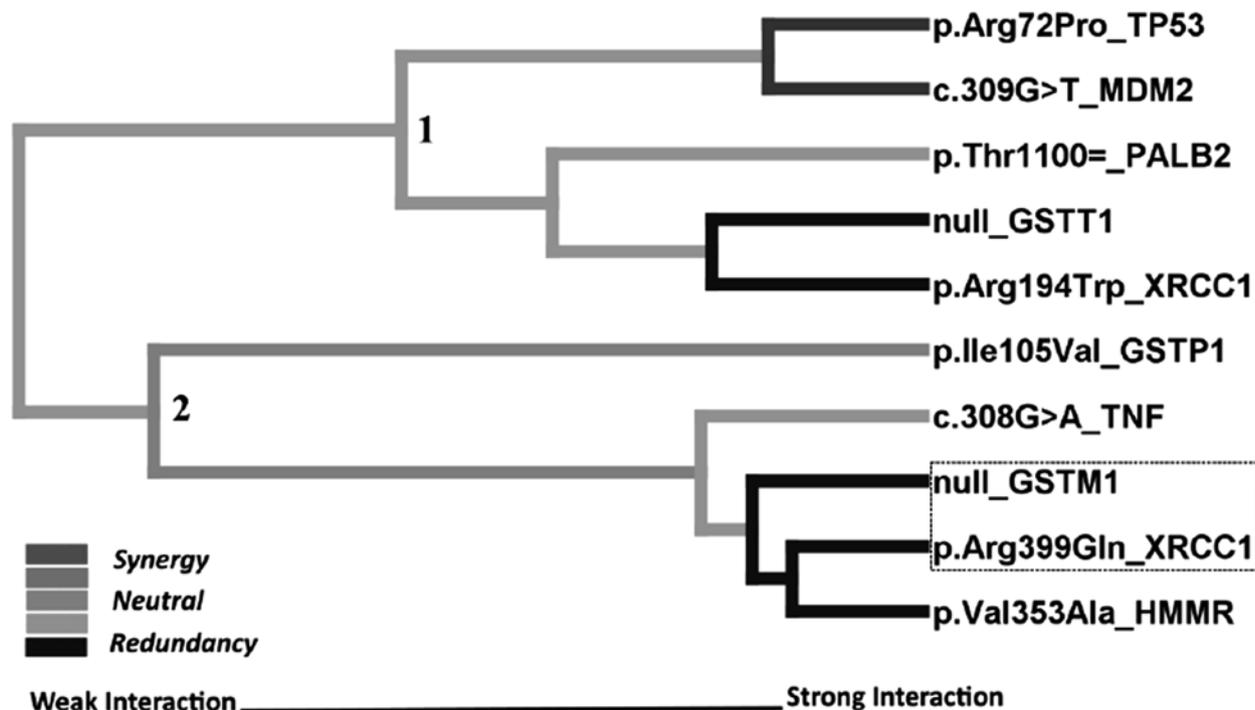
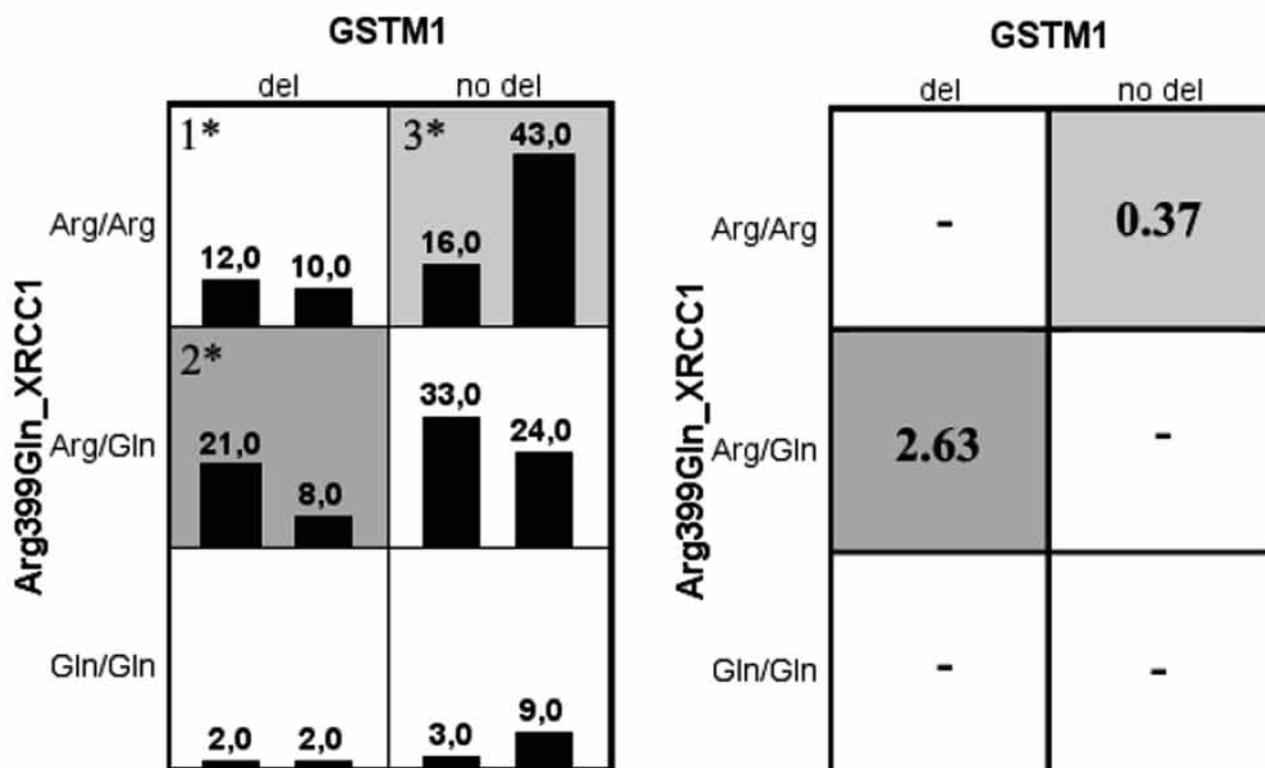


Рис. 5. Оценка дистанции связи (эффекта межгенного взаимодействия) между исследуемыми полиморфизмами генов семейства глутатионтрансфераз и генов репарации ДНК и контроля клеточного цикла; 1 и 2 — номера кластеров



1* (белый цвет) — различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы
 2* (темно-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с высоким риском развития РМЖ (риск-ассоциированный эффект)
 3* (светло-серый цвет) — сочетание генотипов, связанное с высоким риском развития РМЖ (протективный эффект)

Рис. 6. Расчет отношения шансов для комбинации генотипов (гены GSTM1 и XRCC1) в рамках моделирования эффекта межгенных взаимодействий для полиморфизмов, статистически значимо увеличивающих вероятность развития РМЖ

Межгенные взаимодействия полиморфизмов генов семейства глутатионтрансфераз, репарации ДНК и контроля клеточного цикла при раке молочной железы

Дополнительно нами был проведен анализ, направленный на оценку модификации вероятности развития РМЖ при носительстве делеционного полиморфизма генов *GSTM1* и *GSTT1* и аллеля G по ОНП p.Ile105Val гена *GSTP1* в зависимости от генотипа по ОНП p.Arg399Gln (ген *XRCC1*) [14], p.Arg194Trp (ген *XRCC1*) [15], p.Arg72Pro (ген *TP53*) [14], c.309G>T (ген *MDM2*) [14], c.308G>A (ген *TNFA*) [15], p.V353A (ген *HMMR*) [15], p.T1100T (ген *PALB2*) [15].

С использованием программы MDR_анализа была построена модель, отражающая характер взаимодействия полиморфизмов данных генов при РМЖ, (рис. 5). В результате моделирования было выделено 2 кластера:

1. p.Arg72Pro (ген *TP53*), c.309G>T (ген *MDM2*), p.Thr1100= (ген *PALB2*), null (ген *GSTT1*) и p.Arg194Thr (ген *XRCC1*);

2. p.Ile105Val (ген *GSTP1*), c.308G>A (ген *TNF*), null (ген *GSTM1*), p.Arg399Gln (ген *XRCC1*) и p.Val353Ala (ген *HMMR*).

В отношении пары полиморфизмов — null (*GSTM1*) и p.Arg399Gln (*XRCC1*), — была выявлена статистически значимая модель ($X^2=16,37$ ($p<0,0001$), воспроизводимость — 100/100, специфичность — 84,31%, чувствительность — 56,76%), рис. 6.

Ранее нами было показано, что гетерозиготный генотип по ОНП p.Arg399Gln (ген *XRCC1*) ассоциирован с повышенной вероятностью развития РМЖ среди женщин из Кыргызстана [15]. При одновременном наличии генотипов Arg/Gln (ген *XRCC1*) и null (ген *GSTM1*) вероятность развития РМЖ составила — ОШ=2,63.

Обсуждение

Анализ полиморфизма генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* широко представлен в научной литературе. В зависимости от этногеографической принадлежности исследуемых выборок, полученные результаты оценки вклада полиморфизма генов *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1* в увеличение риска развития РМЖ значительно различаются.

В исследовании N. Zgheib et al. анализировался вклад полиморфизмов генов семейства GST в увеличение риска развития РМЖ у женщин, проживающих на территории Ливанской Республики [16]. В результате не было выявлено статистически значимых ассоциаций между делеционными вариантами генов *GSTT1*, *GSTM1* и генотипом GG по полиморфизму p.I105V гена *GSTP1* — с одной стороны, и увеличением ри-

ска возникновения РМЖ — с другой. Аналогично, в работе Sohail A. et al. также изучалась роль полиморфизмов генов семейства GST в увеличении риска развития РМЖ среди женщин, проживающих на территории Пакистана [17]. В общей выборке пациентов делеционные варианты генов *GSTM1* и *GSTT1* не были связаны с увеличением риска развития РМЖ. Однако при анализе, выполненном с учетом таких факторов риска как наследственная отягощенность (наличие РМЖ у ближайших родственников женского пола) и табакокурение, данные генотипы статистически значимо модифицировали риск возникновения РМЖ — наличие гетерозиготного носительства ассоциировалось с высоким риском развития онкопатологии.

В исследовании M. Hashemi et al. был проведен анализ ассоциации полиморфизмов генов семейства GST с риском возникновения РМЖ среди женского населения Ирана [18]. Было обнаружено, что нулевой генотип *GSTM1* является фактором риска предрасположенности к РМЖ: ОШ=2,01, 95% ДИ=[1,78-3,45], $p=0,01$. Для нулевого генотипа *GSTT1* не было найдено статистически значимых различий. В то же время, для полиморфизма p.I105V гена *GSTP1* результаты оказались следующими: для генотипов Ile/Val и Val/Val рассчитанные значения отношения шансов (ОШ) составили 3,29, 95% ДИ=[1,84-5,91], $p<0,0001$ и 20,68, 95% ДИ=[5,66-75,60], $p<0,0001$, соответственно. Таким образом, для данных генотипов по полиморфизмам генов *GSTM1* и *GSTP1* была показана статистически значимая ассоциация, связанная с повышенным риском развития РМЖ.

В заключение необходимо отметить, что в мета-анализе, проведенном L. Qiu et al., была дана оценка роли нулевого генотипа по гену *GSTM1* в увеличении риска развития РМЖ [19]. При включении в модель результатов 59 независимых исследований авторами были получены значения отношения шансов, подтверждающие вклад данного генотипа в увеличение риска развития РМЖ: ОШ=1,10, 95% ДИ=[1,04-1,16]. В то же время, при анализе подгрупп по признаку этнической принадлежности, увеличение риска было отмечено для представителей европеоидной расы (Caucasian race): ОШ=1,05, 95% ДИ=[1,00-1,10], — и азиатов: ОШ=1,21, 95% ДИ=[1,08-1,35]. Также было отмечено, что для пациентов в менопаузе наличие нулевого генотипа по *GSTM1* способно увеличить риск развития РМЖ — ОШ=1,15, 95% ДИ=[1,04-1,28].

Таким образом, полученные нами данные хорошо согласуются с результатами исследований этногеографических групп, расположенных в непосредственной близости от Республики Кыргызстан. Однако имеются и региональные осо-

бенности, в частности, полиморфизм p.Ile105Val оказался не вовлечен в увеличение вероятности развития РМЖ.

Заключение

Каждая популяция характеризуется своим специфическим набором генотипов и особым соотношением частот встречаемости различных аллелей генов глутатионтрансфераз *GSTM1*, *GSTP1* и *GSTT1*. Проведенный анализ частоты распространения генотипов и аллелей по полиморфизмам данных генов позволил определить их вклад в увеличение вероятности возникновения РМЖ среди женщин кыргызской национальности. Среди кыргызских женщин делеция участка гена *GSTM1* явилась генетическим маркером, ассоциированным с повышенной вероятностью развития РМЖ (ОШ=2,18, 95% ДИ 1,38-3,44), $p=0,0007$), тогда как отсутствие протяженной делеции в данном гене, напротив, ассоциировалось с протективным эффектом. Анализ полиморфизмов null (ген *GSTT1*) и p.Ile105Val (*GSTP1*) не выявил статистически значимых различий в распределении частот генотипов или аллелей между больными РМЖ и женщинами из группы сравнения ($p>0,05$).

Полученные нами результаты демонстрируют также важность исследований по оценке значимости совместного вклада ряда независимо действующих или взаимодействующих генов системы биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК и контроля клеточного цикла для выявления возможной совокупности маркеров предрасположенности к РМЖ.

Анализ, направленный на оценку модификации вероятности развития РМЖ при одновременном носительстве полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *XRCC1*, *TP53*, *MDM2*, *TNFA*, *HMMR* и *PALB2*, показал, что при одновременном наличии генотипов Arg/Gln (ген *XRCC1*) и null (ген *GSTM1*) вероятность развития РМЖ составила — ОШ=2,63.

Таким образом, выявление лиц с повышенным риском развития РМЖ на основе молекулярно-генетического анализа является современным подходом в борьбе с данной онкопатологией, так как позволит своевременно провести комплекс профилактических мероприятий по снижению заболеваемости РМЖ как в семьях с отягощенным онкологическим анамнезом, так и в общей популяции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом департамента науки Министерства образования и науки Кыргызской

Республики. № госрегистрации 0007352 от 18 января 2018г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 2015, 136:359–386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
2. Iginov N., Kokteubaeva N., Kudaibergenova I. Epidemiology of breast cancer in females of reproductive age in Kyrgyzstan. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005, 6:36–39.
3. Пузырев В.П., Кучер А.Н. Эволюционно-онтогенетические аспекты патогенетики хронических болезней человека. *Генетика*. 2011. 47,12:1573–1585. [Puzyrev V. P, Kucher A. N. Evolutionary Ontogenetic Aspects of Pathogenetics of Chronic Human Diseases. *Genetic* . 2011. 47, 12:1573–1585. (In Russ.)].
4. Fachal L., Dunning A.M. From candidate gene studies to GWAS and post-GWAS analyses in breast cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2015,30:32-41. DOI: 10.1016/j.gde.2015.01.004.
5. Raunio H., Husgafvel-Pursiainen K., Anttila S. et al. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility — a review. *Gene*. 1995,159: 113–121. DOI: 10.1016/0378-1119(94)00448-2.
6. Афанасьева И.С., Спицын В.А. Наследственный полиморфизм глутатион-Странсферазы печени человека в норме и при алкогольном гепатите. *Генетика*. 1990, 26:1309-1315. [Afanas'eva I.S., Spitsyn V.A. Nasledstvennyj polimorfizm glutation-Stransferazy pecheni cheloveka v norme i pri alkogol'nom gepatite. *Genetika*. 1990, 26: 1309-1315. (In Russ.)].
7. Baranov V.S., Ivaschenko T., Bakay B. et al. Proportion of the *GSTM1* 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum. Genet*. 1996, 97: 516-520. DOI: 10.1007/bf02267078.
8. Ryberg D., Skaug V., Hewer A. et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*. 1997, 18: 1285-1289. DOI: 10.1093/carcin/18.7.1285.
9. Duggan C., Ballard-Barbash R., Baumgartner R.N. et al. Associations between null mutations in *GSTT1* and *GSTM1*, the *GSTP1* Ile(105)Val polymorphism, and mortality in breast cancer survivors. *Springerplus*. 2013, 11: 1-9. DOI: 10.1186/2193-1801-2-450.
10. Spurdle A.B., Fahey P., Chen X. et al. Pooled analysis indicates that the *GSTT1* deletion, *GSTM1* deletion, and *GSTP1* Ile105Val polymorphisms do not modify breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat*. 2010, 122: 281–285. DOI: 10.1007/s10549-009-0601-0.
11. Смирнова Е.Г., Кипень В.Н., Мельнов С.Б., Мохорт А.А. Полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз при раке почки. Молекулярная и прикладная генетика. 2017, 23: 75-82. [Smirnova E.G., Kipen V.N., Melnov S.B., Mokhort A.A. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms // *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. 2017, 23: 75-82. (In Russ.)].
12. Бурденный А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А. и др. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с раком молочной желе-

зы у женщин московского региона. Мол. медицина. 2012, 5: 5-10. [Burdennyu A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Nosikov V.V., Loginov V.I. Association of polymorphic markers of xenobiotic biotransformation genes with breast cancer in females in Moscow region. *Molecular Medicine*. 2012, 5: 5-10. (In Russ.)].

13. Saxena A., Dhillon V.S., Raish M. et al. Detection and relevance of germline genetic polymorphisms in glutathione S-transferases (GSTs) in breast cancer patients from northern Indian population. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009, 115: 537-543. DOI: 10.1007/s10549-008-0098-y.
14. Isakova J., Talaibekova E., Aldasheva N. et al. The association of polymorphic markers Arg399Gln of XRCC1 gene, Arg72Pro of TP53 gene and T309G of MDM2 gene with breast cancer in Kyrgyz females. *BMC Cancer*. 2017, 17(1):1-7. DOI: 10.1186/s12885-017-3762-y.
15. Исакова Ж.Т., Кипень В.Н., Талайбекова Э.Т. и др. Межгенные взаимодействия и вклад генов TP53, XRCC1, TNF α , HMMR, MDM2 и PALB2 в формирование предрасположенности к раку молочной железы у женщин кыргызской национальности. *Вопросы онкологии*. 2019, 65(3): 357-367. [Isakova Zh.T., Kipen V.N., Talaibekova E.T. et al. Interaction between polymorphic variants in TP53, XRCC1, TNF α , HMMR, MDM2, PALB2 genes and their contribution to the formation of a predisposition to breast cancer in women of the Kyrgyz population. *Voprosy Onkologii*. 2019, 65(3): 357-367. (In Russ.)].
16. Zgheib N.K., Shamseddine A.A., Geryess E. et al. Genetic polymorphisms of CYP2E1, GST, and NAT2 enzymes are not associated with risk of breast cancer in a sample of Lebanese women. *Mutat. Res.* 2013, 747: 40-47. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.04.004.
17. Sohail A., Kanwal N., Ali M. et al. Effects of glutathione-S-transferase polymorphisms on the risk of breast cancer: a population-based case-control study in Pakistan. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013, 35: 143-153. DOI: 10.1016/j.etap.2012.11.014.
18. Hashemi M., Eskandari-Nasab E., Fazaeli A. et al. Association between polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer risk in a sample Iranian population. *Biomark. Med.* 2012, 6: 797-803. DOI: 10.2217/bmm.12.61.
19. Qiu L.X., Yuan H., Yu K.D. et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 46,281 subjects. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010, 121: 703-708. DOI: 10.1007/s10549-009-0636-2.

Zh.T. Isakova¹, V.N. Kipen², K.A. Aitbaev¹,
M.A. Usufova³, D.V. Vinnikov^{1,4}, N.M. Bykyev⁵,
B.B. Sultangazieva⁵, N.M. Aldasheva^{1,3}

Polymorphisms in *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* genes and breast cancer risk in women from Kyrgyzstan

¹Research Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, Kyrgyz Republic, Bishkek,

²Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk, Belarus,

³Kyrgyz-Russian Slavic University, Bishkek, Kyrgyz Republic, Bishkek,

⁴Al-Farabi Kazakh National University, School of Public Health, Almaty, Kazakhstan,

⁵National Center of Oncology and Hematology, Bishkek, Kyrgyz Republic

Aim: We studied the intergenic interactions and the contribution of polymorphic loci for *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* genes in the formation of predisposition to breast cancer (BC) in women of Kyrgyz nationality.

Material and method: The study included 87 women of the Kyrgyz ethnic group with the morphologically verified diagnosis of BC and 96 women without cancer and chronic diseases. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed using PCR-RFLP for rs1695 *GSTP1* gene. Deletion polymorphisms in *GSTT1* and *GSTM1* genes were determined using allele-specific real-time PCR. Analysis of the intergenic interactions conducted with MDR 3.0.2 software.

Results: Among women of Kyrgyz nationality, deletion of the *GSTM1* gene region is a genetic marker associated with an increased likelihood of developing breast cancer (OR = 2.18, 95% CI 1.38-3.44), $p = 0.0007$). The absence of deletion in this gene is associated with a protective effect. Analysis of polymorphic markers null (*GSTT1* gene) and p.Ile105Val (*GSTP1* gene) did not reveal statistically significant differences in the frequency distribution of genotypes and alleles between breast cancer patients and women from the comparison group ($p > 0.05$). Analysis of intergenic interactions using MDR analysis showed that, with the simultaneous presence of the Arg/Gln genotypes (*XRCC1* gene) and null (*GSTM1* gene), the probability of developing breast cancer was — OR = 2.63.

Conclusions: Deletion of the *GSTM1* gene and combinations of the Arg/Gln genotypes (*XRCC1* gene) and null (*GSTM1* gene) may contribute to the genetic susceptibility of BC in Kyrgyz women.

Key words: breast cancer, polymorphism, gene, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, kyrgyz population, intergenic interactions, MDR analysis

Поступила в редакцию 27.04.2020 г.