

А.В. Шевченко¹, В.И. Коненков¹, Е.Ю. Гарбуков², М.Н. Стахеева²**ПОЛИМОРФИЗМ РЕГУЛЯТОРНЫХ РЕГИОНОВ ГЕНА
ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ VEGFA У ПАЦИЕНТОК,
БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ОТЯГОЩЕННОСТЬЮ**¹ ФГБУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск² ФГБУ НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН, Томск

Проанализирована ассоциированность функционального полиморфизма гена *VEGFA* в позициях -2578 промоторного региона и в позиции +936 3' нетранслируемого региона в группе здоровых женщин и больных раком молочной железы (РМЖ) с целью выявления информативных маркеров, ассоциированных с риском развития заболевания. В исследование включены образцы ДНК 395 женщин с РМЖ и 298 здоровых женщин. Генотипирование полиморфизмов *C-2578A* и *C+936T VEGFA* осуществляли методом рестриктазного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ). Выявлено повышение частоты генотипа -2578AA в группе больных РМЖ (OR 1,55, 95% CI 1,55-2,29), причем, частота этого генотипа повышена в группах пациенток с общей онкоотягощенностью и с наличием РМЖ у ближайших родственников относительно здоровых женщин (OR=2,03 95% CI 1,26-3,27 и OR=2,22 95% CI 1,13-4,33 соответственно). Частоты генотипов -2578AA/+936CC и -2578CC/+936CT были достоверно выше в группе пациенток с наличием онкоотягощенности по сравнению с группой пациенток без таковой (OR=1,84 95% CI 1,01-3,34 и OR=2,91 95% CI 1,09-8,05 соответственно).

Ключевые слова: Рак молочной железы, полиморфизм, фактор роста эндотелия сосудов.

Развитие, характер и особенности течения многих патологий, так или иначе связанных с ангиогенезом и лимфангиогенезом связывают с факторами роста эндотелия сосудов (VEGF) и их рецепторами. Формирование новых кровеносных сосудов опухоли—принципиальное условие роста новообразования и может считаться фактором злокачественной опухолевой прогрессии в силу двух обстоятельств. Во-первых, ангиогенез—образование и развитие новых кровеносных сосудов—типично индуцируется трансформирующими сигналами, промотирующими прогрессию и непосредственно ин-

дуцирующими экспрессию ангиогенных факторов. В частности, экспрессия сосудистого эндотелиального ростового фактора *A* (vascular endothelial growth factor *A*—VEGFA) индуцируется механизмом Ras_Raf_MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа) и гипоксией, причем одновременно происходит индукция целого ряда протоонкогенов. Кроме того, активный ангиогенез на фоне роста микрососудистой плотности побуждает инвазивные клетки опухоли мигрировать в просвет сосудов и диссеминировать с током крови. В свою очередь, лимфангиогенез, в котором по последним данным также участвует VEGFA, непосредственно промотирует формирование метастазов в лимфатических узлах в пределах дренажного бассейна опухоли [10,11]. В ряде исследований было показано, что повышенный уровень экспрессии VEGF коррелирует с высокой плотностью капиллярной сети опухолевого узла, поздними стадиями заболевания, поражением регионарных лимфатических узлов и, как следствие этого, с низкой послеоперационной выживаемостью больных.

Корреляция повышенного уровня VEGF в периферической крови и усиление экспрессии VEGF в опухолевых тканях с повышением плотности микрососудистой сети в опухоли и неблагоприятным прогнозом, в том числе с агрессивным ростом опухоли, рецидивами, метастазированием и снижением выживаемости показана и при раке молочной железы (РМЖ) [3,4,7]. Существенно, что продемонстрировано влияние полиморфизмов *C-2578A* и *C+936T*, картированных в регуляторных областях гена *VEGFA*, на уровень его экспрессии и уровень медиатора в плазме здоровых доноров и больных РМЖ. Причем, аллель -2578C связывают с повышенным уровнем экспрессии гена *VEGFA*, а аллель +936T—со сниженным уровнем продукции VEGF и его низким содержанием в плазме [8,9].

Учитывая важное значение уровня VEGF в состоянии системы регуляции ангиогенеза и ассоциации этого параметра с аллельными вариантами полиморфных участков регуля-

торных областей кодирующего его гена, нами проанализирован функциональный полиморфизм гена *VEGFA* в позициях -2578 промоторного региона и в позиции +936 3' нетранслируемого региона в группе здоровых женщин и больных РМЖ с целью выявления информативных маркеров, ассоциированных с риском развития заболевания.

Материалы и методы

В исследование включены образцы ДНК больных операбельным РМЖ стадии T1-4N0-3M0 (395 человек), которые получали оперативное лечение в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН. Средний возраст женщин на момент заболевания составил 51,6 лет (20–79 лет). У 143 (36,4%) больных менструальный цикл был сохранен, а 258 (63,6%) находились в менопаузе. При гистологическом исследовании операционного материала у 310 (79%) человек был диагностирован инфильтрирующий протоковый, у 48 (12%) — инфильтрирующий дольковый рак, у остальных — единичные случаи других гистологических форм. Уницентрическая форма роста опухоли отмечена у 319 (81%) женщин, у 51 (13%) наблюдался мультицентрический рост новообразования (с учетом клинически невыявляемых случаев). Образцы ДНК контрольной группы (n=298, европеоиды), сопоставимой по возрасту с выборкой больных РМЖ, были отобраны из банка ДНК популяционной выборки жителей г. Новосибирска (сформирована НИИ терапии СО РАМН). Средний возраст женщин составил 52,4 года (30–84 лет). Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. На данное клиническое исследование было получено разрешение комитета по биоэтической этике ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН.

Генотипирование полиморфизмов *C-2578A* и *C+936T VEGFA* осуществляли методом рестриктазного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ), с использованием специфических праймеров [1,6] и эндонуклеаз рестрикции *Bgl* II и *Fae* I (СибЭнзим, Новосибирск). Электрофорез проводили в 2% агарозном геле. Статистическая обработка результатов включала тестирование распределения частот генотипов на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, расчет частот генотипов регуляторных регионов генов. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к развитию патологии судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR) и его 95% доверительного интервала (95% CI), достоверность различий между группами проводили методом точной оценки Фишера [2].

Результаты исследования и обсуждение

Охарактеризовано распределение частот генотипов *VEGFA* в популяции практически здоровых женщин сибирского региона. Частоты генотипов *C-2578A* и *C+936T VEGFA* в группе популяционного контроля соответствуют распределению частот в европеоидных популяциях и равновесию Харди-Вайнберга в обеих исследуемых группах. Сравнение частот *C-2578A* генотипов в группах больных РМЖ и практически здоровых женщин выявило статистически значимое повышение частоты генотипа -2578AA в группе больных: 26,5% против 18,8% (OR 1,55, 95% CI 1,55-2,29). Различий в распределении ча-

стот *C+936T* генотипов в сравниваемых группах установлено не было. Анализ распределения частот сложного генотипа *C-2578A /C+936T* выявил снижение частоты -2578CC /+936CC среди больных РМЖ: 13,2% против 21,0% (OR 0,57, 95% CI 0,37-0,90). Предполагая, что наследование определенных аллельных вариантов генов цитокинов и, соответственно, их сочетание в генотипах может быть потенциальным фактором риска развития патологии, мы провели анализ распределения генотипов в группах пациентов с РМЖ с наличием наследственной отягощенности относительно пациенток, в семейном анамнезе которых онкопатологии не выявлялось, и в сравнении со здоровыми женщинами.

Частота гетерозиготного генотипа в группах пациенток с наследственной онкологической отягощенностью и РМЖ относительно группы пациенток без наследственной онкоотягощенности (OR=0,50 95% CI 0,32-0,79 и OR=0,50 95% CI 0,26-0,95 соответственно) достоверно снижалась. Кроме того, как оказалось, снижена и частота сложного генотипа -2578AC/+936CC (OR=0,45 95% CI 0,28-0,74). Напротив, частоты генотипов -2578AA/+936CC и -2578CC/+936CT достоверно выше в группе пациенток с наличием онкоотягощенности по сравнению с группой пациенток с отсутствием таковой (OR=1,84 95% CI 1,01-3,34 и OR=2,91 95% CI 1,09-8,05 соответственно).

При анализе частоты встречаемости генотипов *VEGF* у пациенток с общей наследственной отягощенностью по онкологическим заболеваниям и по РМЖ, в частности, нами выявлено достоверное увеличение частоты -2578AA генотипа в обеих группах пациенток относительно здоровых (OR=2,03 95% CI 1,26-3,27 и OR=2,22 95% CI 1,13-4,33 соответственно) и возрастание частоты +936CT генотипа в группе с общей онкоотягощенностью по сравнению со здоровыми женщинами (OR=1,74 95% CI 1,08-2,80). У пациенток со sporadическим РМЖ была снижена частота высокоэкспрессирующего генотипа -2578CC (OR=0,57 95% CI 0,35-0,92) и частота сложного высокоэкспрессирующего генотипа -2578CC/+936CC (OR=0,52 95% CI 0,29-0,93) относительно группы здоровых женщин.

Достаточно хорошо известно, что рак молочной железы (РМЖ) является ведущей причиной смерти женщин репродуктивного возраста в России от злокачественных новообразований. В последнее десятилетие широко ставится вопрос своевременного выявления заболевания, опираясь на достижения исследований генов, вовлеченных в процесс канцерогенеза, и возможность дифференцировать наследственные и sporadические формы РМЖ в зависимости от того, в какой клетке — герминальной или соматиче-

ской—произошло повреждение генетического аппарата. Это дает возможность выявлять женщин с потенциально высоким риском заболевания с последующим использованием эффективных профилактических и лечебных мер. В настоящее время не вызывает сомнения, что помимо генов, обуславливающих развитие заболевания с высокой степенью вероятности, как например мутации в генах BRCA-1 и BRCA-2, продукты которых участвуют в репарации ДНК, существует и другой тип генов, обладающих определенной наследственной предрасположенностью к целому ряду заболеваний, в том числе онкологической природы. Именно к такой группе генов относится ген фактора роста эндотелия сосудов, ответственный за неопластический и лимфангиогенез в опухолевых тканях. Кроме того, показано, что экспрессия фактора роста эндотелия сосудов регулируется продукцией BRCA-1. Нормальный белок BRCA-1 является супрессором промоторной активности *VEGF* через ER- α субъединицу, и регулирует секрецию VEGF в клетках опухоли. Продукция мутантного BRCA-1 не влияет на VEGF экспрессию [5]. Можно предположить, что не только мутации в гене BRCA-1 регулируют промоторную активность *VEGFA* гена, но и полиморфизмы регуляторных локусов как промоторного региона, так и 3' нетранслируемого региона гена *VEGFA* регулируют взаимодействие с BRCA и при наследовании оказывают влияние на развития и течение исследуемой патологии.

В настоящей работе выявлено достоверное увеличение частоты -2574AA генотипа в общей группе пациенток с РМЖ (26,5 %) относительно здоровых женщин (18,8%). Однако, при подразделении пациенток на группы показано, что частота -2578AA генотипа увеличена в группах с общей отягощенностью онкопатологиями (32,3%) и в группе женщин с наследственной формой РМЖ (33,93%) относительно здоровых (18,8%), в то время, как пациентки со спорадическим заболеванием и здоровые женщины по частоте указанного генотипа не различаются. Выяснилось, что риск развития заболевания повышен у пациенток, чьи близкие родственники имели злокачественные новообразования при носительстве сложного генотипа -2578AA/+936CC и -2578CC/+936CT в сравнении с группой пациенток со спорадическим случаем развития РМЖ, что допускает участие полиморфизма исследуемого цитокина в развитии онкопатологии. Это позволяет рассматривать *VEGF* как один из наследственных факторов предрасположенности к развитию заболевания, реализующийся через сложные сети межклеточных взаимодействий, что следует учитывать и на этапах скрининга и попыток

раннего выявления злокачественных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Banyasz I., Szabo S., Bokodi G., et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia // *Mol Hum Reprod.* -2006.-Vol.12.- P. 233–236.
2. Bland J., Altman D. Education and debate. The odds ratio. // *BMJ.* -2000.- Vol.320.- P.1468
3. Chan L.W., Moses M.A., Goley E., et al. Urinary VEGF and MMP levels as predictive markers of 1-year progression-free survival in cancer patients treated with radiation therapy: a longitudinal study of protein kinetics throughout tumor progression and therapy // *J Clin Oncol.* - 2004.- Vol.22.- P.499–506.
4. Foekens J.A., Peters H.A., Grebenchtchikov N., et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer // *Cancer Res.* - 2001.- Vol.61.- P.5407–5414.
5. Kawai H., Li H., Chun P., et al. Direct interaction between BRCA1 and the estrogen receptor regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) transcription and secretion in breast cancer cells // *Oncogene.* — 2002. — Vol.21.- P.7730–7739.
6. Kim J.K., Oh D., Kwak S.Y., et al. Genetic Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF C936T) in the Korean Population // *Korean J Biol Sci.* — 2003.- Vol.7.- P. 261–264.
7. Lynn K.D., Roland C.L., Brekken R.A. VEGF and Pleiotrophin Modulate the Immune Profile of Breast Cancer // *Cancers.* — 2010. — Vol. 2. — P. 970–988.
8. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., et al. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels // *J Vasc Res.* — 2000. — Vol.37. — P.443–448.
9. Shahbazi M., Fryer A.A., Pravica V., et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. // *J Am Soc Nephrol.* - 2002. — Vol.13. — P.260–264.
10. See H.T., Kavanagh J.J., Hu W., Bast R.C. Target therapy for epithelial ovarian cancer: Current status and future prospects // *Int J Gynecol Cancer.* - 2003. — Vol. 13. — P.701–734.
11. Yabushita H., Shimazu M., Noguchi M., et al. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinase in ascetic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer // *Oncol. Rep.* — 2003. — Vol.10. — P. 89–95.

*A.V. Shevchenko¹, V.I. Konenkov¹, E.Yu. Garbukov²,
M.N. Stakheeva²*

POLYMORPHISM OF REGULATORY REGIONS OF GROWTH FACTOR GENE OF VASCULAR ENDOTHELIUM *VEGFA* IN BREAST CANCER PATIENTS WITH FAMILY HISTORY

Scientific-research Institute of clinical and experimental lymphology of SB RAMS, Novosibirsk
Scientific-research Institute of oncology of Tomsk
Scientific Center SB RAMS

Analyzed the association of functional polymorphisms of VEGFA at positions -2578 of promoter region and at position

+936 3' of untranslated region in a group of healthy women and breast cancer patients with the aim to detect informative markers associated with the risk of disease. The study included 395 DNA samples from women with breast cancer and 298 healthy women. Genotyping of polymorphisms of C-2578A and C +936 T VEGFA was performed by restriction analysis of amplification products (RFLP-analysis). There was revealed the increase of the frequency-2578AA genotype in patients with breast cancer (OR 1.55, 95% CI 1,55-2,29), moreover, the

frequency of this genotype increased in the group of patients with a common family history and with breast cancer in close relatives of relatively healthy women (OR = 2,03 95% CI 1,26-3,27 and OR = 2,22 95% CI 1,13-4,33, respectively). Genotype frequencies of -2578AA /+ 936 SS and -2578SS /+ 936 CT were significantly higher in the group of patients with a factor of family history as compared to the group of patients without it (OR=1,84 95% CI 1,01-3,34 and OR=2,91 95% CI 1,09-8,05 respectively).

В статье Т.Г. Ключковой и В.И. Евтушенко «Роль цитомегаловируса в патогенезе опухолевого роста и агрессивности рака предстательной железы», опубликованной в журнале «Вопросы онкологии» (т. 58, № 1, 2012 г.), по техническим причинам не было вставлено упоминание о финансовой поддержке со стороны Министерства образования и науки РФ. Работа была выполнена в рамках госконтракта № 16.552.11.7021.