

Т.И. Иванова, Н.И. Сыченкова, В.А. Хорохорина, Н.И. Рябченко,
С.А. Иванов, Л.И. Крикунова

Ассоциация аллеля E4 (rs 429358) гена аполипопротеина E (APOE) с серозной аденокарциномой яичников

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Обнинск

С целью выявления генетической предрасположенности к развитию серозной аденокарциномы яичников проанализировано распределение аллеля E4 (rs 429358, C) гена APOE в группах здоровых женщин (454 человека) и пациенток с диагнозом серозная аденокарцинома яичников (114 человек). Определялись показатели прогностической эффективности оценки аллеля E4: отношение шансов (OR) и AUC (Area Under Curve) – площадь под ROC кривой. Показано, что носительство аллеля E4 APOE значимо ассоциировано с обнаружением серозной аденокарциномы яичников ($p=0,003$; $OR=1,94$, $AUC=0,55$), а частота встречаемости генотипов, включающих E4, достоверно увеличена ($p=0,02$; $OR=1,8$). При раздельном анализе двух возрастных подгрупп (старше и моложе 46 лет) обнаружено, что опасность развития серозной аденокарциномы яичников значимо повышена у женщин старшего возраста ($p=0,006$; $OR=2,24$, $AUC=0,76$). Необходимо выяснение возможных ассоциаций носительства APOE 4 с серозной аденокарциномой яичников у женщин репродуктивного возраста.

Ключевые слова: APOE, аллель E4, серозная аденокарцинома яичников

В Российской Федерации рак яичников (РЯ) занимает первое место по показателю смертности от рака органов женской репродуктивной системы, составляя около 36% летальных исходов, при этом прирост заболеваемости с 2004 года по 2014 составил 8% [3]. 60-70% всех диагностированных случаев выявляются на III и IV стадиях, поэтому проблема выявления генетических факторов предрасположенности является актуальной. Среди больных раком яичников (РЯ) доля носительниц мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* превышает популяционный уровень в 100 раз (10-15% при частоте встречаемости в популяции 0,1%) [5]. Однако, у большинства женщин РЯ развивается в отсутствие этих мутаций. Соответственно проводятся масштабные исследования, направленные на поиск новых генов, вовлеченных в патогенез заболевания. В рамках проекта «Полногеномный анализ ассо-

циаций (GWAS)» выявлено около двух десятков распространенных аллелей, сопряженных с РЯ, и каждый год появляется информация об обнаружении новых генов такого рода [13, 17, 23]. Ассоциации с заболеваемостью высоко достоверные, но небольшие, поэтому клиническая полезность пока ограничена.

Ранее нами была показана сопряженность минорных аллелей ряда генов, к числу которых относится аполипопротеин E (APOE), с эстрогенозависимыми заболеваниями, и на этом основании предложен способ определения риска развития рака эндометрия [2, 10, 12]. Целью данной работы – был анализ ассоциаций варианта E4 (rs 429358) аполипопротеина E (APOE) с раком яичников.

Материал и методы исследования

Группы исследования составляли здоровые лица (454 человек, средний возраст $43,84 \pm 12,66$), не имевшие в анамнезе гинекологических заболеваний, и пациентки, у которых был обнаружен рак яичников (167 женщин, средний возраст $54,79 \pm 11,04$). Ассоциативный анализ выполнялся для пациенток с серозной аденокарциномой яичников, поскольку эта форма рака представлена в 72% (114 женщин) случаев, причём 75% составляли раки 3 и 4 степени по классификации FIGO.

ДНК выделяли из периферической крови с помощью набора «Wizard Genomic DNA Purification Kit» («Promega») в соответствии с протоколом производителя. В момент взятия образцов обследуемые лица подписывали форму информированного согласия на участие в исследовании, а врачом заполнялась анкета, включающая данные о возрасте, росте, весе, этнической принадлежности, диагнозе заболевания обследованных женщин. Исследование было одобрено Этическим комитетом МРНЦ им. А.Ф. Цыба.

Для генотипирования использовали методику полимеразной цепной реакции с последующей обработкой *CfoI* (Promega) рестриктазой и определением длин фрагментов рестрикции (ПЦР/ПДРФ). Аллель E2 на электрофореграмме имеет 4 полосы, соответствующие 91, 83, 39 и 32 парам оснований. Аллель E4 имеет 5 полос, соответствующие 72, 48, 39, 35 и 32 парам оснований. Аллель E3 характеризуется 5 полосами, соответствующими 91, 49, 39, 36 и 32 парам оснований. Определялись частоты по E3/E2/E4 гаплотипам аполипопротеина E (APOE). Исследование проводилось путём сравнения частот генотипов и аллелей в группах контроля и у больных женщин. Статистический анализ проводили стандартными методами с помощью пакета программ MedCalc. Для обнаружения различий между средними значениями двух выборок, внутри которых показатели (возраст, вес) нормально распре-

делены, применяли t-критерий для независимых выборок. В случае, когда распределение частот не соответствовало нормальному, использовали непараметрические тесты: для двух независимых выборок — Манн-Уитни, при сравнении более чем двух независимых выборок — Крускал и Уоллис. При сравнении частот генотипов применялся точный двусторонний критерий Фишера. Для оценки достоверности различий частот генотипов использовался трендовый тест Армитажа (<http://www.biomedcentral.com/1753-6561/3/S7/S37>). Вклады различных генотипов в заболеваемость определялись с помощью традиционного для исследований «случай-контроль» показателя «odd ratio» (OR – отношение шансов, мера коррелятивной связи) и его 95% доверительный интервал (CI); при отсутствии корреляций между генотипом и заболеванием OR=1, а при OR>1 шанс заболевания при данном генотипе повышен. С целью выяснения взаимосвязей между предрасположенностью к аденокарциноме яичников и изучаемыми признаками выполнялся анализ логистической регрессии с пошаговым алгоритмом оценки уравнений. С помощью ROC (Receiver Operator Characteristic) анализа проводилась оценка прогностической значимости параметров, ассоциированных с серозной аденокарциномой яичников. Определялся показатель прогностической эффективности AUC (Area Under Curve) – площадь под ROC кривой – вероятность отличить больного от здорового, ориентируясь на маркер. Чем выше показатель, тем лучше маркер. Значение 0,5 демонстрирует непригодность потенциального маркера.

Результаты и обсуждение

Белковые продукты E2, E3 и E4 APOE отличаются между собой аминокислотными замещениями в двух сайтах: 112 и 158, обусловленные однонуклотидными полиморфизмами (SNP) в

соответствующих кодонах: С (цитозин) или Т (тимин). Позиции в аминокислотной последовательности белка APOE цистеин 112+аргинин 158, традиционно обозначают аллелем E3; rs7412, цистеин 112+цистеин 158 – традиционное обозначение аллеля E2; rs 429358, аргинин 112+аргинин 158 – традиционное обозначение аллеля E4. В результате нашего исследования, где подавляющую долю (82%) больных составляли женщины старше 46 лет, показано, что аллель E4 гена APOE (rs 429358) выявил значимую ассоциацию с раком яичников, а именно с серозной аденокарциномой. Частота аллеля среди здоровых женщин составляет 9%, что соответствует популяционной частоте для жителей центральных областей России [4]. Среди больных она равна 16% (табл. 1). Частота гомозиготных генотипов E4E4 среди больных составляет 4%, а среди здоровых 0,5%, различия значимы (p=0,005). Носительство аллеля E3 сопряжено с протективным эффектом (OR=0,62; 95% CI 0,43-0,89; p=0,01). Аллель E2 не выявил ассоциацию с серозной аденокарциномой яичников.

Хотя превышение аллеля E4 и генотипов, его включающих, в группе больных значимо (p=0,003 и 0,02 соответственно), однако, величина AUC для аллеля E4 в суммарных выборках больных и здоровых женщин, равная 0,55, указывает на то, что данный показатель сам

Таблица 1. Распределение генотипов APOE среди пациенток с серозной аденокарциномой (АДК) яичников и здоровых женщин

Группы сравнения	Генотипы						Гаплотипы (аллели)		
	E3E3	E3E4	E3E2	E4E4	E2E2	E2E4	E3	E4	E2
АДК n=114 число (%)	71 (62)	25 (22)	11 (10)	5 (4)	1 (1)	1 (1)	178(78)	36(16)	14(6)
Контроль n=444 число (%)	320(72)	70(16)	47(10,5)	2 (0,5)	1(0,1)	4(0,9)	757(85)	78(9)	53(6)
p	0,51	0,13	0,86	0,005	0,37	1	0,01	0,003	0,88

Таблица 2. Частота генотипов и аллеля E4 (rs 429358, C) гена APOE у здоровых женщин и пациенток с серозной аденокарциномой (АДК) яичников в зависимости от возраста

Группы сравнения	Генотипы				Аллели				
	Число (проценты)			P1 X-B	P2 OR 95% CI2	Число (проценты)		P3 OR 95% CI	AUC 95% CI
	ТТ	ТС	СС			Т	С		
АДК сумма	83 (73)	26 (23)	5 (4)	0,20	0,02 1,8 1,11-2,92	192 (84)	36 (16)	0,003 1,94 1,27-2,97	0,55 0,51-0,59
Контроль сумма	367 (82,5)	74 (17)	2 (0,5)	0,44		808 (91)	78 (9)		
АДК≥46	69 (73,4)	22 (23,4)	3 (3,2)	0,53	0,02 2,13 1,16-3,94	160 (85)	28 (15)	0,006 2,24 1,28-3,92	0,76 0,72-0,79
Контроль ≥46	159 (85,5)	27 (14,5)	0	0,32		345 (93)	27 (7)		
АДК≤45	14 (70)	4 (20)	2 (10)	0,18	0,25 1,8 0,67-4,98	32 (80)	8 (20)	0,06 2,27 0,99-5,19	0,56 0,50-0,62
Контроль ≤45	208 (81)	47 (18)	2 (1)	0,74		463 (90)	51 (10)		

Примечание: p¹ – уровень статистической значимости различий частот генотипов с равновесием Харди-Вайнберга; p² – уровень статистической значимости различий частот генотипов ТС+СС у больных по сравнению со здоровыми женщинами; p³ – уровень статистической значимости различий частоты аллеля С (E4) между больными и здоровыми женщинами

по себе является плохим маркером при таком сравнении. Среди суммарной группы здоровых женщин, основная доля которых представлена в репродуктивном возрасте, тоже много носительниц этого аллеля. Есть данные об ассоциации E4 с уровнем стероидных гормонов, при этом особенно его негативное влияние распространяется на женщин [21]. Поэтому были учтены возраст и индекс массы тела (ИМТ) больных и здоровых женщин. Анализ выполнялся на модели логистической регрессии с пошаговым алгоритмом оценки уравнений. Было обнаружено, что негативное влияние аллеля E4 сопряжено с возрастом (OR=2,35; AUC=0,76; 95% доверительный интервал от 0,72 до 0,79, p=0,0004; процент конкордации модели 79,5). ROC анализ сопряженности возраста с заболеванием выявил пороговую величину – 46 лет (AUC=0,74; 95% доверительный интервал от 0,71 до 0,78; p<0,0001). В табл. 2 приведено распределение частот аллеля E4 (rs 429358) в суммарной выборке и в группах, стратифицированных по возрасту.

Частоты генотипов соответствуют равносному распределению Харди-Вайнберга (во всех случаях p>0,05), что может быть обусловлено малочисленностью группы больных женщин (табл. 2). Показано, что в обеих возрастных подгруппах частота E4 в два раза выше по сравнению со здоровыми женщинами, но значимость различий выявлена только для женщин старшего возраста (p=0,006). У носительниц генотипов E4 старше 46 лет шанс развития серозной аденокарциномы яичников в два раза выше, чем у носительниц мажорного аллеля (p=0,02) (табл. 2). В случае больных моложе 46 лет значимая ассоциация аллеля E4 с раком яичников не выявлена (p=0,06) (табл. 2). Наличие высокоспецифичных маркеров, позволяющих определить РЯ на начальных бессимптомных стадиях, могло бы увеличить выборку больных женщин репродуктивного возраста, что вероятно позволило бы выявить значимость ассоциации аллеля E4 и в этой возрастной категории. Сравнение распределения частоты аллеля E4 (rs 429358; C) между двумя возрастными подгруппами у больных (20% и 15%, p=0,47) и здоровых женщин (10% и 7%, p=0,19) не выявило значимых отличий (табл. 2).

Известно, что белок — аполипопротеин E (APOE) является одним из основных липопротеинов плазмы с антиоксидантными, противовоспалительными и антиатерогенными свойствами [11, 23]. Отдельные изоформы белка вовлечены в ряд патофизиологических процессов: болезнь Альцгеймера, агрессивный рассеянный склероз, гиперлиппротеинемия III типа, повышенный уровень холестерина и

триглицеридов в плазме, атеросклероз [1, 7]. Предполагают, что белок APOE посредством целого ряда биологических процессов (передача сигналов, липидный транспорт, поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза) участвует в распространении, пролиферации и выживании опухолевых клеток. Выявлена его потенциальная роль в качестве опухоли-ассоциированного маркера: уровень экспрессии APOE значительно повышен в клетках злокачественных карцином яичников и эндометрия [6, 8, 9]. Ингибирование APOE приводило к апоптозу только тех раковых клеток, в которых этот ген был оверэкспрессирован. Авторы полагают, что экспрессия APOE отражает степень злокачественности опухоли и определяет её дальнейшую эволюцию. Можно предположить, что изоформа E4 APOE по сравнению с E3 за счёт лучшего и более прочного связывания с липидами способствует быстрому и полному усвоению энергонасыщенных жиров, тем самым создавая благоприятные условия для быстрорастущих злокачественных клеток [15].

Влияние полиморфизма E2/E3/E4 на развитие онкологических заболеваний не является однозначным. Было обнаружено, что аллель E4 (rs 429358) сопряжен с развитием рака молочной железы у женщин [16, 19], а аллель E2 (rs7412) с развитием колоректального рака у мужчин и раком тела матки с сопутствующей гиперплазией эндометрия у женщин [10, 21]. Проведённое в Нидерландах исследование корреляций гаплотипов E2/E3/E4 гена APOE с уровнем холестерина плазмы и раком показало, что носители разных аллелей не отличаются между собой повышенным риском онкологических заболеваний, суммированным по всем типам и локализациям вкуче для мужчин и женщин [20]. Американскими исследователями была выявлена предрасположенность к раку толстой кишки для носителей генотипов E2/E2, E2/E4, E4/E4 старше 65 лет независимо от пола (OR=1,88) [18]. Исследователи из группы А. И. Яшина (Центр популяционного здоровья и старения университет Дюка, Дурхам, США) установили, что основными факторами, модулирующими системный эффект аллеля E4 (rs 429358) APOE на продолжительность жизни являются не нейродегенеративные и сердечно-сосудистые патологии, а пол, возраст и онкологические заболевания [14]. В зависимости от возраста носительство варианта E4 повышает риск онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний у женщин и снижает у мужчин.

Выявленная в настоящей работе ассоциация аллеля E4 (rs 429358) гена APOE с серозной

аденокарциномой яичников для женщин старше 46 лет отчасти согласуется с данными литературы относительно его роли в развитии злокачественных заболеваний. Анализ вариантов гена АРОЕ мог бы помочь выявить группу риска и, не исключено, позволил бы своевременно предпринять превентивные меры. Итоги проведенной работы позволяют надеяться на дальнейшее развитие исследований в данной области.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 14-44-03072 р_центр_а.

ЛИТЕРАТУРА

- Иванова Т. И., Полуэктова М. В., Хорохорина В. А. и др. Влияние генотипов АРОЕ на биохимические показатели метаболизма железа и липидов у больных неопластическими заболеваниями эндометрия и здоровых женщин // Исследования и практика в медицине. – 2014. – Т. 1 (1). – С. 35–44.
- Иванова Т. И., Крикунова Л. И., Рябченко Н. И. и др. Способ определения риска развития рака тела матки. Патент РФ № 2558059, зарегистрир. 10.07.2015.
- Каприн А. Д., Старинский В. В. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. – 250 с.
- Козлов А. И., Боринская С. А., Санина Е. Д. «Экономный Генотип» ε4/ ε4 по гену АРОЕ и риск метаболических нарушений в популяциях уральских народов // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 2 (9). – С. 17–23.
- Соколенко А. П., Иевлева А. Г., Митюшкина Н. В. и др. Синдром наследственного рака молочной железы и яичников в Российской Федерации // ACTA NATURAE. – 2010. – Т. 2 (4). – С. 35–39.
- Chen Y.-C., Pohl G., Wang T.-L. et al. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer // Cancer Reseach. – 2005. – Vol. 1. – P. 331–337.
- Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families // Science. – 1993. – Vol. 5123. – P. 921–923.
- Hough C.D., Sherman-Baust C.A., Pizer E.S. et al. Advances in brief large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer // Gynecologic Oncology. – 2000. – Vol. 60. – P. 6281–6287.
- Huvila J., Brandt A., Rojas C.R. et al. Gene expression profiling of endometrial adenocarcinomas reveals increased apolipoprotein E expression in poorly differentiated tumors // International Journal of Gynecological Cancer. – 2009. – Vol. 19. – P. 1226–1231.
- Ivanova T.I., Krikunova L.I., Ryabchenko N.I. et al. Association of the apolipoprotein E 2 allele with concurrent occurrence of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2015. – Vol. 2015. – P. e 593658.
- Jofre-Monseny L., Minihane A.-M., Rimbach G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk // Molecular Nutrition & Food Research. – 2008. – Vol. 52. – P. 131–145.
- Kondrashova T.V., Neriishi K., Ban S. et al. Frequency of hemochromatosis gene (HFE) mutations in Russian healthy women and patients with estrogen-dependent cancers // Biochimica et Biophysica Acta — Molecular Basis of Disease. – 2006. – Vol. 1762. – P. 59–65.
- Kuchenbaecker K.B., Ramus S.J., Tyrer J. et al. Identification of six new susceptibility loci for invasive epithelial ovarian cancer // Nat Genet. – 2015. – Vol. 47 – P. 164–171.
- Kulminski A.M., Arbeev K.G., Culminkaya I. et al. Age, gender, and cancer but not neurodegenerative and cardiovascular diseases strongly modulate systemic effect of the apolipoprotein E4 allele on lifespan // PLoS genetics. – 2014. – Vol. 10. – P. e10041411.
- Nguyen D., Dhanasekaran P., Nickel M. et al. Molecular basis for the differences in lipid and lipoprotein binding properties of human apolipoproteins E3 and E4 // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49. – P. 10881–10889.
- Porrata-Doria T., Matta J.L., Acevedo S.F. Apolipoprotein E allelic frequency altered in women with early-onset breast cancer // Breast cancer: Basic and clinical Research. – 2010. – Vol. 4. – P. 43–48.
- Scarborough P.M., Weber R.P., Iversen E.S. et al. A cross-cancer genetic association analysis of the DNA repair and DNA damage signaling pathways for lung, ovary, prostate, breast and colorectal cancer // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2015. – Vol. 25. – P. 193–200.
- Slattery M.L., Swenney C., Murtaugh M. et al. Associations between apoE genotype and colon and rectal cancer // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26. – P. 1422–1429.
- Surekha D., Vishnupriya S., Sailaja K. et al. Influence of apolipoprotein E gene polymorphism on the risk for breast cancer // International Journal of Human Genetics. – 2008. – Vol. 8. – P. 277–282.
- Trompet S., Jukema J.W., Katan M.B. et al. Apolipoprotein E genotype, plasma cholesterol, and cancer: a Mendelian randomization study // American Journal of Epidemiology. – 2009. – Vol. 170. – P. 1415–1421.
- Uchoa M.F., Moser V.A., Pike C.J. Interactions between inflammation, sex steroids, and Alzheimer's disease risk factors // Frontiers in Neuroendocrinology. 2016. (43). C. 60–82.
- Watson M.A., Gay L., Stebbings W.S. et al. Apolipoprotein E gene polymorphism and colorectal cancer: gender-specific modulation of risk and prognosis // Clinical science. – 2003. – Vol. 104. – P. 537–545.
- Winham S.J., Pirie A., Chen Y.A. et al. Investigation of exomic variants associated with overall survival in ovarian cancer // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2016. – Vol. 25. – P. 446–454.
- Zhou T.-B. Signaling pathways of prohibitin and its role in diseases // Journal of receptor and signal transduction research. – 2013. – Vol. 33. – P. 73–78.

Поступила в редакцию 27.10.2016 г.

*T.I. Ivanova, N.I. Sychenkova, V.A. Khorokhorina,
N.I. Ryabchenko, S.A. Ivanov, L.I. Krikunova*

**The association of the apolipoprotein E4
allele (rs 429358) with ovarian serous
adenocarcinoma**

Tsyb Medical Radiological Research Centre –
branch of the National Medical Research Radiological
Centre
Obninsk

The distribution of *APOE 4* allele (rs 429358, C) was analyzed in healthy women (N=454) and patients with ovarian serous adenocarcinoma (N=114) in order to identify genetic predisposition to the disease. We determined the prognostic indicators of the *E4* allele as a marker: odds ratio (OR) and AUC (Area Under Curve) - an area under the ROC curve. It was shown that *APOE 4* allele was significantly associated with ovarian serous adenocarcinoma ($p = 0,003$; OR=1,94; AUC=0,55). The *E4* genotypes frequency was significantly increased among patients ($p = 0.02$; OR=1,8). Separate analysis of the two age subgroups (over 46 years and younger) found that the chance of developing ovarian serous adenocarcinoma was significantly increased for older women ($p = 0,006$; OR = 2,24, AUC = 0,76). Possible associations of *APOE 4* with the ovarian serous adenocarcinoma in women of reproductive age deserve further studying.

Key words: *APOE*, allele *E4*, ovarian serous adenocarcinoma