

UDC 616-006.66:618.19-006-08
DOI: 10.32345/USMYJ.3(117).2020.23-35

Клімук Богдана Тарасівна

Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України, м. Київ, Україна

Поліник Світлана Іванівна

Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України, м. Київ, Україна

Рибченко Людмила Анатоліївна

К.м.н., Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України, м. Київ, Україна

Захарцева Любов Михайлівна

Д.м.н., проф., Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Дуган Олексій Мартем'янович

Д.б.н., проф., Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», м. Київ, Україна

Клименко Сергій Вікторович

Д.м.н., проф., Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

АСОЦІАЦІЯ ГЕНОТИПІВ ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНІВ *FGFR2*, *LSP* ТА *LOC643714* З

З РИЗИКОМ ВИНИКНЕННЯ ПОЗИТИВНОГО МУТАЦІЙНОГО СТАТУСУ ГЕНА *HER-2/NEU* У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Анотація. Рак молочної залози є переважно результатом дії генетичних та екологічних факторів, що призводять до накопичення мутацій в основних регуляторних генах. Генетична схильність до цієї онкопатології може бути обумовлена мутаціями у окремих генах, таких як *BRCA1* та *BRCA2*, або кумулятивним ефектом у результаті взаємодії генів низької пенетрантності. В роботі розглянуто алелі, що визначають ризик розвитку раку молочної залози з високим та низьким рівнем пенетрантності та обговорюються поточні зусилля щодо виявлення додаткових генів сприйнятливості. Визначення генів схильності є передумовою індивідуалізованої оцінки ризику раку молочної залози та зменшення захворюваності на рак молочної залози. Основною метою даного дослідження є визначення асоціативних зв'язків поліморфних варіантів *rs2981582* і *rs1219648* гена *FGFR2*, *rs3817198* гена *LSP* та *rs3803662* гена *LOC643714* з ризиком виникнення раку молочної залози та розвитком позитивного мутаційного статусу гена *Her-2/neu*. Група обстежених включала 300 жінок з гістологічно підтвердженим діагнозом раку молочної залози. На матеріалах пухлинних тканин цих пацієнток проводили флуоресцентну гібридизацію *in situ* для визначення ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu*. Розподіл генотипів та алелей проводили шляхом полімеразно-ланцюгової реакції в реальному часі для наступних поліморфних варіантів *rs1219648* гена *FGFR2* ($n = 44$), *rs2981582* гена *FGFR*, ($n = 99$), *rs3817198* гена *LSP1* ($n = 75$) та *rs3803662* гена *LOC643714* ($n = 82$). Серед досліджуваних генотипів поліморфних варіантів *rs3817198* гена *LSP1*, *rs3803662* гена *LOC643714*, *rs2981582* та

rs1219648 гена FGFR2, із включенням алелі ризику, не було визначено асоціації із схильністю до розвитку раку молочної залози у жінок відповідно до мультиплікативної моделі успадкування ($p > 0,05$). При кододомінантній моделі успадкування, спостерігається асоціативний зв'язок з ризиком виникнення раку молочної залози та поліморфізмами rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714 та rs2981582 гена FGFR2 при гомозиготних генотипах по рідкісних алелях ($p < 0,05$). Жінки, що хворі на рак молочної залози та мають позитивний ампліфікаційний статус гена Her-2/neu, частіше були носіями алелі ризику G (OR = 4,80; 95 % CI 1,21–28,04, $p < 0,05$) та генотипу GG (OR = 5,82; 95 % CI 1,38–16,74, $p < 0,05$) поліморфізма rs3803662 гена LOC643714 порівняно з групою жінок із негативним ампліфікаційним статусом гена Her-2/neu у пацієнток з діагнозом рак молочної залози. Результати проведеного дослідження можуть бути корисними для пошуку додаткових генетичних предикторів розвитку раку молочної залози та позитивного мутаційного статусу гена Her-2/neu.

Ключові слова: FGFR2, LOC643714, LSP, генетичний поліморфізм, мутаційний статус гена Her-2/neu, рак молочної залози.

Вступ. За даними GLOBOCAN 2018, у жінок всього світу найчастіше діагностованою злоякісною пухлиною та провідною причиною смерті є рак молочної залози (PMЗ) (Bray et al., 2018). Відомо, що PMЗ – гетерогенне захворювання зі змінним прогнозом та клінічними характеристиками та комбінованим ефектом генетичної та негенетичної етіології. У діагностиці та розвитку PMЗ важливим є генетичні аспекти. Спорадичний PMЗ часто зумовлений мутацією генів спадкової схильності. Його частка, в залежності від популяції, складає приблизно 5–10 % від всієї кількості підтверджених карцином в молочній залозі (Goldberg & Borg, 2006).

У осіб з обтяженим PMЗ сімейним анамнезом, що є носіями мутацій задіяних в онкопатогенезі генів, індивідуальний ризик розвитку спадкового PMЗ збільшується порівняно з особами з відсутністю даної патології у родині. Наприклад, ризик розвитку PMЗ у пацієнтів, у яких визначені мутації генів високої пенетрантності (BRCA1, BRCA2, TP53, RAD51) збільшується у 10 разів, в генах середньої (CHEK2, BRIP1, PALB2, ATM) та низької пенетрантності (FGFR2, TOX3, MAP3K11, CAMK1D, SNRPB, COX11, LSP1, MERIT40, ESR1, ANKLE1) – у 2–5 та у 2 рази, відповідно (Turashvili & Brogi, 2017).

Багатофакторна парадигма успадкування дає змогу проаналізувати співвідношення генотипу пацієнтів з PMЗ для детекції нових ділянок генів ризику. Кілька варіантів низького ризику, які знаходяться в межах інтрону,

включаючи сегменти ДНК, які не кодують білки чи регуляторні області, були ідентифіковані у наступних генах FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 (2q35, 6q22,33, 8q24). Основна частина з цих досліджень проводилась серед жінок європейського походження, в суміжних дослідженнях на популяції азіатських жінок було виявлено приблизно половину ідентифікованих локусів (Dankova et al., 2019). Це може пояснюватися нерівноважністю генів у досліджуваних популяціях. В якості інших факторів можуть виступати відмінність в чисельності населення, сімейна історія, стан менопаузи та статус пухлинного рецептора естрогена (ER), рецептора прогестерона (PR), мутаційний статус гена Her-2/neu (Fejerman & Ziv, 2008).

Вважається, що варіанти генів FGFR2, LOC643714 та LSP1 з низьким рівнем ризику розвитку PMЗ мають більший вплив на групи підвищеного ризику, ніж на спорадичні випадки. Шанси, притаманні цим варіантам, не високі (відносний ризик від 1,1 до 1,3), але їх гетерозиготний стан зустрічається часто (Alshammari, 2019).

Без знання інших модифікованих чи взаємодіючих факторів клінічна корисність доказів, отриманих з таких варіантів, незначна.

Інструментом вибору визначення зв'язку між ризиком захворювання та загальними генетичними змінами, після завершення проекту «Проект Геном людини», став повногеномний пошук асоціацій (Genome-Wide Association Studies – GWAS). Завдяки GWAS

було знайдено перші варіанти ризику РМЗ, що знаходились в локусі FGFR2. Підсилення дії та гіперекспресія гена FGFR2 спостерігається в 10–15 % РМЗ. Більш детальні дослідження зміцнили дану асоціацію, при цьому виявили 90 додаткових локусів генів, які були пов'язані з ризиком розвитку РМЗ. Спадкові фактори впливають на ризик РМЗ на ряду з клінічними характеристиками РМЗ, такими як рецептор естрогена або статус гена Her-2/neu (Cox et al., 2016).

За рекомендаціями ASCO/CAP 2018 року, для інтерпретації FISH-досліджень мутаційного статусу гена Her-2/neu, кількість випадків РМЗ з сумнівним (невизначеним) результатом досліджуваного гена значно зростає (12,2 %), у порівнянні з попередніми редакціями 2013 та 2007 років (6,6 % та 1,9 %, відповідно) (Klimuk et al., 2019). Для уточнення мутаційного статусу пропонується провести повторне проведення імуногістохімічного дослідження наявності білка Her-2/neu на поверхні пухлинної клітини, що є, в ряді випадків, неможливим. Тому для пошуку сурогатних маркерів позитивного чи негативного ампліфікаційного статусу гена Her-2/neu в роботі проводиться співставлення даних щодо впливу SNP на патогенез пухлинних клітин в молочній залозі жінок української популяції.

Дослідження асоціації поліморфізмів вказаних генів з наявністю ампліфікації гена Her-2/neu в клітинах РМЗ дозволяє оцінити роль генетичного апарату в розвитку Her-2/neu-позитивного/негативного РМЗ.

Аналіз опублікованих досліджень щодо вивчення молекулярно-генетичних маркерів РМЗ дав можливість відібрати перспективні гени-кандидати до схильності розвитку цієї окопатології з урахуванням її патогенезу.

Мета дослідження: визначити асоціативні зв'язки генотипів поліморфізмів rs2981582 і rs1219648 гена FGFR2, rs3817198 гена LSP та rs3803662 гена LOC643714 з ризиком виникнення РМЗ та мутаційним статусом гена Her-2/neu.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ: В дослідженні з визначення мутаційного статусу гена Her-2/neu включено пацієнок з гістологічно підтвердженим діагнозом РМЗ (n = 300).

Групу хворих було сформовано з Київського міського клінічного онкологічного центру, Національного інституту раку та Київського обласного онкологічного диспансеру. Вік пацієнок на момент встановлення діагнозу РМЗ складав від 31 до 59 років (середній вік $48,8 \pm 6,7$ років). Зразки пухлин РМЗ були зібрані в патологоанатомічних відділеннях медичних закладів, де лікували хворих. В роботі аналізували розподіл генотипів та алелей наступних поліморфних варіантів: rs1219648 (на хромосомі 10q26 в інтроні гена FGFR2, n = 44), rs2981582 (на хромосомі 10q26 в інтроні гена FGFR2, n = 99), rs3817198 (на хромосомі 11p15 в інтроні гена LSP1, n = 75) та rs3803662 (на хромосомі 16q12 в ділянці гена LOC643714, що не кодує транскрипт, n = 82). Для визначення генетичних поліморфізмів проводили виділення геномної ДНК зі зразків периферичної крові, використовуючи набір NeoPrep100 DNA Magnet (NeoGene, Україна) та з фіксованих формаліном і залитих парафіном зразків тканини пухлини, за використанням набору для виділення ДНК Quiamp DNA Micro Kit (Quiagen, Hilden, Німеччина).

Визначення поліморфних варіантів rs1219648 та rs2981582 гена FGFR2, rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714 проводили методом алель-специфічної ПЛР з детекцією результатів в режимі реального часу на ампліфікаторі LightCycler II (Roche, Швейцарія) з використанням специфічних праймерів та зондів. Загальний об'єм реакційної суміші складав 20 мкл та містив 10,4 мкл води для ПЛР, 1,0 мкл Reagent Mix, 2,0 мкл FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Німеччина), 1,6 мкл MgCl₂ та 5,0 мкл кожного зразка ДНК. Набір Reagent Mix містив з попередньо змішані праймери, а набір HybProbes – пару олігонуклеотидних зондів, що можуть гібридуватися поруч на ДНК-матриці, причому один з таких зондів мічений флуоресцентом на 3'-кінці (3fl), а інший – червоним барвником на 5'-кінці (5LC).

Послідовності праймерів та зондів були підібрані з використанням програми dpSNP Short Genetic Variations v141001 («TIB MOLBIOL», Німеччина). Праймери синтезовані фірмою «TIB MOLBIOL» (Німеччина),

Поліморфізм	Праймер	Послідовність (5' → 3')
rs2981582 гена FGFR2	прямий	CATCGCCACTTAATGAACCTGTTTG
	зворотній	GGAGAGTCCACCTGGTGCCTGCCTG
rs3817198 гена LSP1	прямий	TCACCTGATACCAGATTCAAACCTCTC
	зворотній	GCTCATTTCACTAGAGTCAGCCCGG
rs3803662 гена LOC643714	прямий	CTCTCCTTAATGCCTCTATAGCTGTC
	зворотній	CTTAGCGAAGAATAAAACTGTGGAC
rs1219648 гена FGFR2	прямий	AGCACGCCTATTTTACTTGACACAC
	зворотній	CTCTTCAAGGATGGCCATGGCTTGT

Таблиця 1. Праймери для визначення досліджуваних поліморфізмів генів FGFR2, LSP1 та LOC643714.

зонди – синтезовані фірмою Roche Diagnostics (Німеччина). Праймери для визначення досліджуваних поліморфізмів генів FGFR2, LSP1, LOC643714 представлені в таблиці 1.

Ампліфікацію розпочинали з «гарячого старту» (попереднє прогрівання робочої суміші 10 хв при 95°C) з подальшим проведенням 45 циклів власне реакції, етапи якої мали такі характеристики: денатурація – 95°C, 10 с; відпал – 60°C, 10 с; елонгація – 72°C, 15 с. Криву плавлення отримували за умов охолодження та поступового нагріву продукту реакції від 40°C до 95°C з кроком 0,2°C.

На кожному етапі відбувалася фіксація сигналу у відповідних спектрах флуоресценції. Після успішного проведення ампліфікаційної реакції переходили до аналізу отриманих даних в режимі реального часу згідно рекомендацій фірми-виробника приладу.

Мутаційний статус гена HER-2/neu визначали за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ*. Для дослідження брали резекційний матеріал карциноми, фіксованої з використанням формаліну, залитої в парафін та нарізаної мікротомом МНТ-84 (товщина 4–5 мкм). Для очищення від парафіну, використовували три зміни орто-ксілолу (по 5 хв). Після депарафінізації зразків, проводили регідратацію етанолом: в 100, 90 і 70 % розчинах (по 5 хв). Після цього зразки ополіскували в PBS та прогрівали в цитратному буфері на паровій бані 30 хв. Ферментну обробку тканин проводили шляхом інкубування в розчині протеази в PBS концентрацією 100 мкг/мл (3 хв, 37°C). Препарати промивали в PBS в ємкостях Копліна за

кімнатної температури, дегідратацію проводили розчинами етанолів: 70, 90 і 100 %-му (по 2 хв). Для денатурації використовували 70 % розчин формаміду в 2×SSC (15 хв, 75°C). Після чого проводили повторно дегідратацію попередньо охолодженими спиртами (–20°C). Денатурацію проби HER-2/neu (PathVysion, DNA Probe) здійснювали шляхом нагріву до 75°C (5 хв). Готову до використання пробу наносили на підготовлений препарат тканини. Після чого проводили етап гібридизації шляхом інкубування зразків 15 годин в термостаті за сталої температури 37°C. Пост-гібридизаційну відмивку препаратів від залишку гібридизаційного реагенту здійснювали шляхом промивання в розчині NP 40 (0,3 %) в 2×SSC (2 хв, 73°C). Для фарбування ядер використовували розчин DAPI (150 нг/мл). Зразки після всіх етапів фарбування залишали в морозильній камері (–20°C).

Аналіз препаратів проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus BX 51 з ртутною лампою 100 Вт та набором фільтрів DAPI, FITC, Cy3. Для аналізу одного зразка брали від 20 до 60 клітин. Відповідно до рекомендацій ASCO 2018 щодо випадків з позитивним результатом відносили зразки, які характеризувалися співвідношенням кількості сигналів гена Her-2/neu до центромери більше або рівне 2,0 і середньою кількістю копій самого гена $\geq 4,0$ сигналів на клітину. Відсутність ампліфікації в клітинах вважали при співвідношенні (Her-2/neu)/CEP17 < 2 та середній кількості копій Her-2/neu $< 4,0$ сигналів на клітину.

Генотип/ алель	Частоти		χ^2 [p]	OR	
	Дослід (n = 75)	Контроль (n = 18408)		значення	95 % CI
Мультиплікативна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
T	0,667	0,706	1,11 [0,29]	0,83	0,59–1,17
C	0,333	0,294		1,20	0,85–1,69
Домінантна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
TT	0,533	0,498	0,36 [0,55]	1,15	0,73–1,81
CC + CT	0,467	0,502		0,87	0,55–1,37
Рецесивна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
TT + CT	0,800	0,914	12,74 [0,00]	0,38	0,21–0,67
CC	0,200	0,086		2,64	1,50–4,66

Таблиця 2. Розподіл у дослідній та контрольній групах частоти алелей та генотипів поліморфізму rs3817198 гена LSP1 залежно від моделі успадкування

Протокол дослідження схвалений комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Державної установи Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України.

Дослідження було погоджене з Комітетом медичної етики ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України" та проводилося згідно принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицини та відповідних Законів України.

Статистична обробка отриманих даних проводилася із застосуванням тесту Фішера, критерію Пірсона. Для порівняння груп хворих на РМЗ із позитивним та негативним статусом гена Her-2/neu щодо наявності обраних поліморфізмів, використовували адитивну модель успадкування (тест Кохрана-Армітаджа для лінійних трендів). Дані експериментів опрацьовувалися за допомогою програмного пакету Statistica 8.0, використовуючи параметричні та непараметричні методи статистичного аналізу. Для роботи з даними використовували програмне забезпечення Microsoft Excel 2016 та Social Scince Statistics calculator.

Результати. Серед хворих на РМЗ були ідентифіковані гомозиготні генотипи TT та CC rs3817198 гена LSP1 у 53,3 % (40 із 75) та 20,0 % (15 із 75) випадків відповідно. Гетерозиготний генотип CT rs3817198 гена LSP1 був визначений у 26,7 % пацієнтів (20 із 75).

Порівняння частот алелей та генотипів rs3817198 гена LSP1 між контрольною та досліджуваною групами наведені в таблиці 2. В представленому дослідженні у якості контрольної групи була використана бази даних агрегації геному (gnomAD) європейської популяції (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3817198#seq_hash). Статистично значущу різницю між частотами генотипів досліджуваної групи, у порівнянні з контрольною, визначено лише для гомозигот по рідкісній алелі C ($\chi^2 = 12,74$, $p < 0,05$)

Розподіл генотипів за поліморфізмом rs3803662 гена LOC 643714 у групі пацієнток з РМЗ був наступним: GG був ідентифікований у 56,2 % (46 із 82), частоти генотипів GA і AA були однаковими та становили по 21,9 % (18 із 82). При співставленні генотипів за поліморфізмом rs3803662 гена LOC 643714 серед досліджуваної групи у порівнянні з контрольною отримано статистично значущу різницю по генотипу AA ($\chi^2 = 19,30$, $p < 0,05$), згідно рецесивної моделі успадкування (табл. 3.).

Генотип/ алель	Частоти		χ^2 [p]	OR	
	Дослід (n = 82)	Контроль (n = 18460)		значення	95 % CI
Мультиплікативна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
G	0,671	0,710	1,22 [0,27]	0,83	0,60–1,15
A	0,329	0,290		1,20	0,87–1,67
Домінантна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
GG	0,561	0,504	1,06 [0,3]	1,26	0,81–1,95
AA + GA	0,439	0,496		0,80	0,51–1,23
Рецесивна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
GG + GA	0,780	0,916	19,30 [0,00]	0,33	0,19–0,55
AA	0,220	0,084		3,06	1,81–5,18

Таблиця 3. Розподіл у дослідній та контрольній групах частоти алелей та генотипів поліморфізму rs3803662 гена LOC643714 залежно від моделі успадкування

Серед поліморфних варіантів rs2981582 гена FGFR2 частота генотипу GG складала 42,5 % (42 із 99), частота GA та AA – 34,3 % (34 із 99) та 23,2 % (23 із 99), відповідно. У випадку рецесивної моделі успадкування, при порівнянні частот генотипів даного поліморфізму між досліджуваною та контрольною групами, статистично значущу різницю визначили для гомозиготного генотипу за рідкісною алелю А ($\chi^2 = 5,63$, $p < 0,05$) (табл. 4).

Для поліморфізму rs1219648 гена FGFR2 серед жінок із захворюванням РМЗ розподіл генотипів був наступним: AA – 52,3 % (23 із 44), AG – 25 % (11 із 44) та GG – 22,7 % (10 із 44).

За рецесивної моделі успадкування (табл. 5) визначено статистично значущу різницю щодо частот гомозиготного генотипу за рідкісною алеллю G між дослідною та контрольною групами ($\chi^2 = 4,41$ $p < 0,05$).

Таблиця 4. Розподіл у дослідній та контрольній групах частоти алелей та генотипів поліморфізму rs2981582 гена FGFR2 залежно від моделі успадкування

Генотип/ алель	Частоти		χ^2 [p]	OR	
	Дослід (n = 99)	Контроль (n = 18442)		значення	95% CI
Мультиплікативна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
G	0,596	0,616	0,33 [0,56]	0,92	0,69–1,22
A	0,404	0,384		1,09	0,82–1,45
Домінантна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
GG	0,424	0,379	0,84 [0,36]	1,20	0,81–1,80
AA + GA	0,576	0,621		0,83	0,56–1,24
Рецесивна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
GG + GA	0,768	0,853	5,63 [0,02]	0,57	0,36–0,91
AA	0,232	0,147		1,75	1,10–2,80

Генотип/ алель	Частоти		χ^2 [p]	OR	
	Дослід (n = 44)	Контроль (n = 18466)		значення	95% CI
Мультиплікативна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
A	0,648	0,608	0,58 [0,45]	1,19	0,77–1,84
G	0,352	0,392		0,84	0,54–1,31
Домінантна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
AA	0,773	0,846	1,83 [0,18]	0,62	0,30–1,25
GG + AG	0,227	0,154		1,62	0,80–3,28
Рецесивна модель успадкування (тест χ^2 , df = 1)					
AA + AG	0,523	0,370	4,41 [0,04]	1,87	1,03–3,38
GG	0,477	0,630		0,54	0,30–0,97

Таблиця 5. Розподіл у дослідній та контрольній групах частоти алелей та генотипів поліморфізму rs1219648 гена FGFR2 залежно від моделі успадкування

Серед досліджуваних генотипів поліморфних варіантів rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714, rs2981582 та rs1219648 гена FGFR2, із включенням алелі ризику, не було визначено асоціації із схильністю до розвитку РМЗ у жінок згідно мультиплікативної моделі успадкування ($p > 0,05$) (табл. 6).

Таким чином, частота гомозиготних генотипів за рідкісними алелями ризику РМЗ rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена

LOC643714, rs2981582 та rs1219648 гена FGFR2 були вищими серед хворих із цими злаякісними неоплазіями. Це вказує на можливий асоціативний зв'язок гомозиготних генотипів за алелями ризику із розвитком РМЗ.

Однак, згідно кодомінантної моделі успадкування спостерігається асоціативний зв'язок з ризиком виникнення РМЗ та поліморфізмами rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC64371 та rs2981582 гена FGFR2 при го-

Таблиця 6. Асоціація ризику РМЗ з однонуклеотидними поліморфізмами rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714, rs2981582 та rs1219648 гена FGFR2 серед українських жінок

SNP		rs3817198	rs3803662	rs2981582	rs1219648
Ген		LSP1	LOC643714	FGFR2	FGFR2
Алелі (референт/ризик)		T/C	A/G	G/A	A/G
MAF (контроль/випадок)		0,29/0,33	0,29/0,33	0,38/0,40	0,39/0,35
Кодомінантна модель	Гетерозигота OR (95 % CI)	0,87 (0,55–1,37)	0,80 (0,51–1,23)	0,83 (0,56–1,24)	1,62 (0,80–3,28)
	P_{trend}	0,55	0,3	0,36	0,18
	Гомозигота OR (95 % CI)	2,64 (1,50–4,66)	3,06 (1,81–5,18)	1,75 (1,10–2,80)	0,54 (0,30–0,97)
	P_{trend}	0,00	0,00	0,02	0,54
Мультиплікативна модель	PER-allele OR (95 % CI)	1,20 (0,85–1,69)	1,20 (0,87–1,67)	1,09 (0,82–1,45)	0,84 (0,54–1,31)
	P_{trend}	0,29	0,27	0,56	0,45

Поліморфізми	Генотип/алель	Статус гена <i>Her-2/neu</i>		χ^2 [p]	OR (95% CI)
		Позитивний, n (частка)	Негативний, n (частка)		
LSP1 rs3817198	TT	5 (0,081)	35 (0,538)	0,02 [0,89]	0,86 (0,23–3,25)
	TC	3 (0,548)	17 (0,262)		1,21 (0,28–5,22)
	CC	2 (0,371)	13 (0,200)		1,00 (0,19–5,28)
	T	13 (0,650)	87 (0,669)	0,03 [0,87]	0,92 (0,34–2,47)
	C	7 (0,350)	43 (0,331)		1,09 (0,41–2,93)
LOC643714 rs3803662	GG	12 (0,857)	34 (0,507)	4,77 [0,03]	5,82 (1,21–28,04)
	GA	1 (0,071)	17 (0,254)		0,23 (0,03–1,86)
	AA	1 (0,071)	16 (0,239)		0,25 (0,03–2,02)
	G	25 (0,893)	85 (0,634)	7,10 [0,01]	4,80 (1,38–16,74)
	A	3 (0,107)	49 (0,366)		0,21 (0,06–0,73)
FGFR2 rs2981582	GG	5 (0,227)	37 (0,481)	0,98 [0,32]	0,32 (0,11–0,95)
	GA	13 (0,591)	21 (0,273)		3,85 (1,44–10,33)
	AA	4 (0,182)	19 (0,247)		0,68 (0,20–2,25)
	G	23 (0,523)	95 (0,617)	1,26 [0,26]	0,68 (0,35–1,34)
	A	21 (0,477)	59 (0,383)		1,47 (0,75–2,89)

Таблиця 7. Розподіл алелей та генотипів поліморфізмів rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714 та rs2981582 гена FGFR2 серед хворих на РМЗ відповідно до ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu*.

мозиготних генотипах по рідкісних алелях ($p < 0,05$). При аналізі частот алелей та генотипів поліморфізму rs1219648 гена FGFR2 серед досліджуваної групи, у порівнянні з контрольною, згідно кодомінантної та мультиплікативної моделей не було визначено асоціації із ризиком розвитку РМЗ ($p > 0,05$).

Тому наявність асоціативного зв'язку мутаційного статусу гена *Her-2/neu* при РМЗ серед хворих досліджуваної групи досліджувалася лише для поліморфних варіантів rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714 та rs2981582 гена FGFR2 (табл. 7).

Співставлення груп пацієток з РМЗ зі встановленим мутаційним статусом гена *Her-2/neu* щодо досліджуваних поліморфних варіантів виконували у відповідності до адитивної моделі успадкування (тест Кохрана-Армітаджа для лінійних трендів, $\chi^2 = [0, 1, 2]$, $df = 1$) (табл. 7).

Відповідно до до ампліфікаційного статусу гена *Her-2/neu* статистично значущої різниці щодо розподілу алелей та генотипів поліморфізмів rs3817198 гена LSP1 та rs2981582 гена FGFR2 серед пацієнтів з РМЗ не було визначено.

Таким чином, асоціації поліморфізмів rs3817198 гена LSP1 та rs2981582 гена FGFR2 із ризиком розвитку позитивного статусу гена *Her-2/neu* при РМЗ не було встановлено.

Дані щодо алельного розподілу поліморфізму rs3803662 гена LOC643714 демонстрували, що переважав генотип GG, частота якого становила 56,8 % серед усіх обстежених хворих. Жінки із позитивним ампліфікаційним статусом гена *Her-2/neu* при РМЗ частіше були носіями алелі ризику G (OR = 4,80; 95 % CI 1,21–28,04, $p < 0,05$) та генотипу GG (OR = 5,82; 95 % CI 1,38–16,74, $p < 0,05$) у порівнянні із групою жінок із негативним ампліфікаційним статусом гена *Her-2/neu* при РМЗ. Таким чином, шанси розвитку позитивного мутаційного статусу гена *Her-2/neu* при РМЗ збільшуються в 4,8 рази при носійстві алелі G ($p = 0,01$) та в 5,8 разів у разі генотипу GG ($p = 0,03$). У випадку носійства референтної алелі A спостерігали протективний вплив, зменшуючи вірогідність розвитку позитивного мутаційного статусу гена *Her-2/neu* при РМЗ у 4,8 рази ($p = 0,01$) та за носійства генотипів AA, GA у 4,0 і 4,3 разів відповідно

($p = 0,03$). Тому ми вважаємо доцільним проводити дослідження поліморфізму rs3803662 гена LOC643714 у хворих на РМЗ з метою прогнозування ризику розвитку позитивного мутаційного статусу гена Her-2/neu, шляхом збільшення дослідницької вибірки та включення додаткових критеріїв і характеристик.

Обговорення. Клініко-патологічні дослідження, що визначають особливості розвитку онкологічного захворювання пацієнтів, в основному включають стадії: оцінки лімфатичних вузлів, розміру пухлин, аналіз молекулярного підтипу, але сукупність отриманих даних все ще не дає можливості зробити точну оцінку клінічного прогнозу перебігу захворювання для пацієнтів.

Аналіз даних нашого дослідження з визначення поліморфних варіантів rs1219648 гена FGFR2 не надав статистичного підтвердження асоціації з РМЗ, на відміну від результатів, отриманих іншими науковими групами (Hosseini et al., 2018; Wang et al., 2018). Це можна пояснити популяційними відмінностями, адже при дослідженні когорт жінок Ірану та Китаю таку асоціацію було виявлено; недостатньою кількістю вибірки ($n = 44$).

Порівняння отриманих результатів інших трьох генетичних варіантів поліморфізмів, що пов'язані з РМЗ (rs2981582, rs3817198 та rs3803662), демонстрували суттєвий зв'язок з високим ризиком розвитку онкопатології та не суперечили даним інших дослідників в незалежності від популяційних особливостей (Shu et al., 2019).

Раніше повідомлялося, що алель ризику поліморфізму rs3803662 гена LOC643714 регулює спорідненість зв'язування білка FOXA1 з хроматином, потенційно впливаючи на експресію LOC643714 (Jones et al., 2013). Як і в інших дослідженнях, нами було показано, що генотип GG поліморфного варіанту rs3803662 пов'язано з гіршим прогнозом та збільшенням ризику виникнення РМЗ з виявленою ампліфікацією гена Her-2/neu (Seksenyau et al., 2015; Thanh et al., 2018). Очевидно, отримані дані свідчать про вагому роль поліморфізму

rs3803662 в прогресуванні пухлини, що потенційно пояснює агресивний сценарій розвитку досліджуваної онкопатології та мутаційного статусу гена Her-2/neu.

До слабких сторін проведеного нами дослідження треба віднести, по-перше, обмежену кількість поліморфних варіантів – лише чотири, що не є достатнім для кореляції між даними поліморфізмами та прогнозом розвитку Her-2/neu-позитивного РМЗ. По-друге, розмір вибірки був не великим, дослідження потрібно повторити на більших вибірках.

Представлене дослідження є фрагментом наукових робіт визначення фармакогенетичного профілю системних захворювань людини. Отримані результати свідчать про доцільність створення генетичного біобанкінгу різних типів неоплазій та можуть стати основою для цього.

Висновки: Було встановлено асоціативний зв'язок генотипів rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714 та rs2981582 гена FGFR2 з ризиком виникнення РМЗ ($p < 0,05$). При цьому, наявність алелі ризику G та генотипу GG поліморфізму rs3803662 гена LOC643714, демонстрували асоціацію з позитивним мутаційним статусом гена Her-2/neu при РМЗ ($p < 0,05$). Перспективи подальших досліджень полягають в асоціативних дослідженнях з пошуку зв'язків нових генетичних маркерів пов'язаних з розвитком мутаційного статусу Her-2/neu при РМЗ.

Фінансування: Дане дослідження виконане в рамках науково-дослідної роботи «Порівняльне дослідження генетичної схильності до розвитку раку молочної залози у жінок, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на ЧАЕС», шифр 545, № держ. реєстрації 0114U002848 на базі науково-дослідної лабораторії генетики раннього розвитку людини та медико-генетичного консультування відділу медичної генетики Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alshammari, F. D. (2019). Breast cancer genetic susceptibility: With focus in Saudi Arabia. *Journal of Oncological Sciences*, 5(1), 6–12.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Cox, D. G., Curtit, E., Romieu, G., Fumoleau, P., Rios, M., Bonnefoi, H., Bachelot, T., Soulié, P., Jouannaud, C., Bourgeois, H., Petit, T., Tennevet, I., Assouline, D., Mathieu, M. C., Jacquin, J. P., Lavau-Denes, S., Darut-Jouve, A., Ferrero, J. M., Tarpin, C., ... Pivot, X. (2016). GWAS in the SIGNAL/PHARE clinical cohort restricts the association between the FGFR2 locus and estrogen receptor status to HER2-negative breast cancer patients. *Oncotarget*, 7(47), 77358.
- Dankova, Z., Zubor, P., Grendar, M., Kalman, M., Zelinova, K., Jagelkova, M., Kapinova, A., Simova, D., Vlckova, D., & Lasabova, Z. (2019). The breast cancer genetic risk model based on eight single nucleotide polymorphisms. *The Breast*, 44, 137.
- Fejerman, L., & Ziv, E. (2008). Population differences in breast cancer severity. In *Pharmacogenomics* (pp. 323–333).
- Goldberg, J. I., & Borgen, P. I. (2006). Breast cancer susceptibility testing: Past, present and future. In *Expert Review of Anticancer Therapy*.
- Hosseini, M., Houshmand, M., & Froozan, S. (2018). Association of FGFR2 and TOX3 Genetic Variants With the Risk of Breast Cancer in Iranian Women. *Archives of Breast Cancer*, 118–121.
- Jones, J. O., Chin, S. F., Wong-Taylor, L. A., Leaford, D., Ponder, B. A. J., Caldas, C., & Maia, A. T. (2013). TOX3 Mutations in Breast Cancer. *PLoS ONE*, 8(9), 74102.
- Klimuk, B. T., Duhan, O. M., Polinik, S. I., Rybchenko, L. A., & Klymenko, S. V. (2019). Impact of ASCO/CAP 2007, 2013 and 2018 recommendations on Her-2/neu gene amplification status testing in patients with breast cancer. *Visnik Ukrain's'kogo Tovaristva Genetikiv i Selekcioneriv*, 17(2), 159–164.
- Seksenyan, A., Kadavallore, A., Walts, A. E., de la Torre, B., Berel, D., Strom, S. P., Aliahmad, P., Funari, V. A., & Kaye, J. (2015). TOX3 is expressed in mammary ER+ epithelial cells and regulates ER target genes in luminal breast cancer. *BMC Cancer*, 15(1), 22.
- Shu, J., Hui, X., Zheng, X., Zhao, J., Xu, Z., Chen, Y., Lu, C., & Li, J. (2019). Correlation of FGFR2 rs2981582 polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a case-control study in a Chinese population. *Journal of International Medical Research*, 47(10), 4753–4763.
- Thanh, N. T. N., Lan, N. T. T., Phat, P. T., Giang, N. D. T., & Hue, N. T. (2018). Two polymorphisms, rs2046210 and rs3803662, are associated with breast cancer risk in a vietnamese case-control cohort. *Genes and Genetic Systems*, 93(3), 101–109.
- Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor heterogeneity in breast cancer. *Frontiers in Medicine*, 4, 227.
- Wang, Y., Zhang, H., Lin, M., & Wang, Y. (2018). Association of FGFR2 and PI3KCA genetic variants with the risk of breast cancer in a Chinese population. *Cancer Management and Research*, 10, 1305.

UDC 616-006.66:618.19-006-08

Klimuk Bogdana Tarasivna

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Polinik Svitlana Ivanivna

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Ribchenko Lyudmila Anatoliyivna

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Zakhartseva Lubov Mikhajlovna

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Dugan Oleksyi Martemjanovich

National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, Kyiv, Ukraine

Klymenko Sergiy Viktorovich

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

**ASSOCIATION OF GENOTYPES OF POLYMORPHISMS OF GENES FGFR2, LSP,
AND LOC643714 WITH THE RISK OF A POSITIVE MUTATIONAL STATUS
OF THE HER-2/NEU GENE IN BREAST CANCER PATIENTS**

Annotation. Breast cancer is the result of genetic and environmental factors that lead to the accumulation of mutations in key regulatory genes. Genetic predisposition to cancer pathologies may be due to mutations in individual genes, such as in BRCA1 and BRCA2, or may be due to a cumulative effect as a result of the interaction of genes of low penetrance. This paper reviews the alleles that determine the risk of high and low penetrance breast cancer and discusses ongoing efforts to identify additional susceptibility genes. The identification of propensity genes is a prerequisite for an individualized assessment of breast cancer risk and a decrease in the incidence of breast cancer. The main goal of this study is to determine the associations of polymorphic variants rs2981582 and rs1219648 of FGFR2, rs3817198 of LSP and rs3803662 of LOC643714 with the risk of breast cancer and the development of a positive mutational status of Her-2/neu. The study group included 300 women diagnosed with breast cancer. Fluorescent in situ hybridization was performed on tumor tissue materials from these patients to determine the amplification status of the Her-2/neu. The distribution of genotypes and alleles was performed by real-time polymerase chain reaction for the following polymorphic variants rs1219648 of FGFR2 (n = 44), rs2981582 of FGFR (n = 99), rs3817198 of LSP1 (n = 75) and rs3803662 of the LOC643714 (n = 82). Among the studied genotypes of polymorphic variants rs3817198 of LSP1, rs3803662 of LOC643714, rs2981582 and rs1219648 of FGFR2, with the inclusion of the risk allele, the association of the propensity to develop breast cancer in women according to the multiplicative model of inheritance ($p > 0.05$) was not determined. According to the codominant inheritance model, there is an associative relationship with the risk of breast cancer and polymorphism rs3817198 of LSP1, rs3803662 of LOC64371 and rs2981582 of FGFR2 with homozygous genotypes for rare alleles ($p < 0.05$). Women with a positive amplification status of the Her-2/neu, patients with breast cancer, were more likely to carry the risk allele G (OR = 4.80; 95% CI 1.21–28.04, $p < 0.05$) and genotype GG (OR = 5.82; 95% CI 1.38–16.74, $p < 0.05$) rs3803662 polymorphism of LOC643714, compared with a group of women with negative amplification status of Her-2/neu in patients diagnosed with breast cancer. The results of this study can be useful for searching for additional genetic predictors of breast cancer and a positive mutational status of Her-2/neu.

UDC 616-006.66:618.19-006-08

Климук Богдана Тарасовна

Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины, г. Киев, Украина

Полинык Светлана Ивановна

Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины, г. Киев, Украина

Рыбченко Людмила Анатолієвна

К.м.н., Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины, г. Киев, Украина

Захарцева Любов Михайлівна

Д.м.н., проф., Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Дуган Алексей Мартемьянович

Д.б.н., проф., Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского», г. Киев, Украина

Клименко Сергей Викторович

Д.м.н., проф., Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины, Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П.Л. Шупика, Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

АССОЦИАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ FGFR2, LSP И LOC643714 С РИСКОМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА HER-2/NEU У БОЛЬНЫХ НА РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Аннотация. Рак молочной железы является преимущественно результатом действия генетических и экологических факторов, приводящих к накоплению мутаций в основных регуляторных генах. Генетическая предрасположенность к этой онкопатологии может быть обусловлена мутациями в отдельных генах, таких как в BRCA1 и BRCA2, или кумулятивным эффектом в результате взаимодействия генов низкой пенетрантности. В работе рассмотрено аллели, которые определяют риск развития рака молочной железы с высоким и низким уровнем пенетрантности и обсуждаются текущие усилия по выявлению дополнительных генов восприимчивости. Определение генов склонности является предпосылкой индивидуализированной оценки риска рака молочной железы и уменьшению заболеваемости на рак молочной железы. Основной целью данного исследования является определение ассоциативных связей полиморфных вариантов rs2981582 и rs1219648 гена FGFR2, rs3817198 гена LSP и rs3803662 гена LOC643714 с риском возникновения рака молочной железы и развитием положительного мутационного статуса гена Her-2/neu. Группа обследованных включала 300 женщин с гистологически подтвержденным диагнозом рак молочной железы. На материалах опухолевых тканей этих пациенток проводили флуорисцентную гибридизацию *in situ* для определения амплификационного статуса гена Her-2/neu. Распределение генотипов и аллелей проводили путем полимеразной цепной реакции в реальном времени для следующих полиморфных вариантов rs1219648 гена FGFR2 (n = 44), rs2981582 гена FGFR, (n = 99), rs3817198 гена LSP1 (n = 75) и rs3803662 гена LOC643714 (n = 82). Среди исследуемых генотипов полиморфных вариантов rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC643714, rs2981582 и rs1219648 гена FGFR2, с включением аллели риска, не определено ассоциации склонности к развитию рака молочной железы у женщин по мультипликативной модели наследования (p > 0,05). Согласно кодоминантных

модели наследования, наблюдается ассоциативная связь с риском возникновения рака молочной железы и полиморфизм rs3817198 гена LSP1, rs3803662 гена LOC64371 и rs2981582 гена FGFR2 при гомозиготных генотипа по редким аллелях ($p < 0,05$). Женщины с диагнозом рак молочной железы с положительным амплификационным статусом гена Her-2/neu больные на рак молочной железы чаще были носителями аллели риска G (OR = 4,80; 95% CI 1,21–28,04, $p < 0,05$) и генотипа GG (OR = 5,82; 95% CI 1,38–16,74, $p < 0,05$) полиморфизма rs3803662 гена LOC643714, по сравнению с группой женщин с отрицательным амплификационным статусом гена Her-2/neu. Результаты проведенного исследования могут быть полезными для поиска дополнительных генетических предикторов развития рака молочной железы и положительного мутационного статуса гена Her-2/neu.

Ключевые слова: FGFR2, LOC643714, LSP, генетический полиморфизм, мутационный статус гена Her-2/neu, рак молочной железы.