

Л. Є. Фіщук, Н. Г. Горовенко

ПОЛІМОРФНІ ВАРІАНТИ ГЕНА ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ У ЖІНОК, ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, В УКРАЇНІ

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна,
Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика,
Київ, Україна

УДК 575.191:618.19-006.6-055.2(477)

Л. Е. Фищук, Н. Г. Горовенко

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ У ЖЕНЩИН, БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, В УКРАИНЕ

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина,
Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика,
Киев, Украина

В работе представлены результаты исследования влияния полиморфных вариантов 4a/4b, G894T, T-786C гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) на риск развития рака молочной железы (PMЖ) у женщин в Украине. Было установлено, что результаты для общих и распределенных возрастных групп отличаются. Для женщин в возрасте от 36 до 54 лет наличие аллеля C-786 гена eNOS увеличивает риск развития PMЖ, а при наличии сочетания генотипов 4b/4b× G894T гена eNOS риск PMЖ снижен. Для женщин младшей возрастной группы (от 18 до 35 лет) и старшей возрастной группы (старше 54 лет) достоверных различий не обнаружено.

Ключевые слова: ген, полиморфизм, eNOS, PMЖ.

UDC 575.191:618.19-006.6-055.2(477)

L. Ye. Fishchuk, N. G. Gorovenko

POLYMORPHIC VARIANTS OF THE ENDOTHELIAL NO-SYNTHASE GENE IN UKRAINIAN WOMEN WITH BREAST CANCER

SI "The Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine,
The National Medical Academy of Post-Graduate Education Named After P. L. Shupik, Kyiv, Ukraine

Breast cancer (BC) is one of the most common cancer pathologies in women. Genetic polymorphism of endothelial NO-synthase gene (eNOS) is considered to be associated with cancer development, in particular, with BC.

Aim. To study the influence of polymorphic variants of endothelial NO-synthase gene on the risk of BC development in Ukrainian women.

Materials and methods. In the study 131 patients with histologically proven diagnosis of breast cancer of I and II stages were enrolled. The control group was composed of 102 women without cancer. Polymorphic variants 4a/4b, G894T, T-786C of eNOS were studied with the use of PCR and PCR-RFLP methods.

Results. No statistically significant relationships were found between eNOS genotypes and breast cancer risk for common group. The results of analysis for common group and subgroups distributed by age are different. For women from 18 to 35 years old the significant differences were not found. For women from 36 to 54 years old an increased risk of BC development is determined by the presence of C-786 allele of eNOS gene. Decreased risk of BC development was associated with the presence of combined genotypes 4b/4b×G894T of eNOS. In women older than 54 years the significant differences were not found.

Conclusion. The results suggest that polymorphic variants of eNOS and their associations are prognostic markers for BC development in women from 36 to 54 years old. The results of analysis are different in total cohort and in subgroups distributed by age.

Key words: gene, polymorphism, eNOS, BC.

За даними Національного канцер-реєстру, рівень захворюваності на рак молочної залози (PMЗ) в Україні, як і в усьому світі, зростає. У нашій країні щороку виявляється близько 16–17 тис. хворих на PMЗ, а показники захворюваності дорівнюють приблизно 66 випадкам на 100 тис. населення, щороку близько 7,5 тис.

хворих помирають від цієї хвороби [1]. Епідеміологічні дослідження показують, що виникнення PMЗ має мультифакторну природу. Зокрема, на ризик його розвитку впливають: іонізуюче випромінювання, вживання жирівмісних продуктів, алкоголю, тютюну, гормонів і гормональних контрацептивів тощо. Однак не в усіх

жінок, що зазнали впливу цих факторів, розвивається PMЗ. Це підтверджує належність PMЗ до мультифакторних захворювань.

Оксид азоту (NO) бере участь у багатьох фізіологічних і патофізіологічних процесах, у тому числі вазодилатації, нейротрансмісії, макрофаг-опосередкованому імунітеті та канцеро-



генезі. Для NO характерні антиоксидантні властивості, він перешкоджає патогенному впливу ліпопротеїдів низької щільності [2]. Ще в 1995 р. D. C. Jenkins показав, що NO має подвійну дію: якщо у великих концентраціях йому властива протипухлинна активність, то в низьких він є промотором пухлинного росту, що можна пояснити активацією ангиогенезу [3]. Пізніше, на основі проведених досліджень було показано, що надпродукція NO може викликати ушкодження ДНК та інгібувати процеси репарації ДНК [4]. Також NO може підвищувати активність ДНК-залежних протеїназ, які належать до системи репарації ДНК [5].

Оксид азоту синтезується клітинами із L-аргініну під дією ферменту NO-синтази. Сьогодні ідентифіковано три ізоформи NO-синтаз, які названі так за тим типом клітин, де вони були вперше виявлені: конститутивні — нейрональна (nNOS), ендотеліальна (eNOS) та індукцйбельна (iNOS). Відомо, що РМЗ — це злоякісна пухлина, яка в більшості випадків розвивається з епітеліальних клітин, саме тому при вивченні механізмів розвитку РМЗ найчастіше досліджують eNOS.

Ген eNOS, що кодує ендотеліальну NO-синтазу, локалізований на хромосомі 7 (q35-36) і складається з 26 екзонів і 23 інтронів. Серед варіантів гена, який кодує цей фермент, найбільшу увагу привертають поліморфізм 4a/b 4-го інтрону, поліморфізм G894T у 7-му екзоні, що призводить до заміни глутаміну на аспарагін у 298-му положенні білка, та поліморфізм T-786C промотора гена eNOS.

Поліморфізм 4a/b зумовлений наявністю 5- або 4-кратних тандемних повторів 27 п. н. в інтроні 4. Нормальний варіант містить 5 повторів (позначається як 4b), мутантний — 4 (позначається як 4a). У носіїв алельного варіанта 4a відмічають зменшення концентрації

синтезованого ферменту порівняно з носіями алельного варіанта 4b [6].

Трансверсія G-T у позиції 894-ї нуклеотидної послідовності гена eNOS (rs1799983) приводить до заміни GAG на GAT у 7-му екзоні, отже, до заміни глутамінової кислоти на аспарагінову в білковій послідовності (Glu298Asp). Показано, що для носіїв гомозиготного варіанта T894T характерна більш низька активність eNOS порівняно з носіями варіанта G894G. Можливим механізмом впливу цього поліморфізму на активність ферменту може бути його нерівноважне зчеплення зі ще не встановленими варіантами гена eNOS.

Поліморфізм T-786C (rs2070744) у промоторній частині гена впливає на рівень експресії eNOS. При дослідженнях було виявлено, що наявність алеля C у положенні -786 промотора гена eNOS призводить до зниження активності промоторного регіону й експресії eNOS [7].

Роботи, присвячені вивченню впливу поліморфних варіантів гена eNOS на ризик розвитку РМЗ, існують [8; 9], але їхні результати неоднозначні, а в більшості з них досліджувалися один або два поліморфних варіанти гена eNOS. В Україні такі дослідження не проводилися.

Метою нашої роботи було дослідити вплив поліморфних варіантів 4a/4b, G894T, T-786C гена eNOS на ризик розвитку РМЗ у жінок України.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні взяли участь 131 жінка з гістологічно підтвердженим діагнозом РМЗ I і II стадій, які проходили лікування в Київській міській онкологічній лікарні. До групи контролю увійшли 102 жінки без онкологічної патології. Групи були порівнювані за віком.

На проведення роботи було отримано дозвіл комітету з біо-

етики НМАПО імені П. Л. Шупика. Усі жінки дали інформовану згоду на проведення дослідження.

Для молекулярно-генетичного дослідження використовували ДНК, екстраговану з лейкоцитів периферійної крові. Виділення ДНК здійснювали з використанням комерційного набору «ДНК-сорб-В» (ЦНДІ епідеміології Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації). Генотипування за поліморфними варіантами 4a/4b та T-786C гена eNOS проводили з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), поліморфного варіанта G894T гена eNOS — ПЛР-ПДРФ згідно з методиками, наведеними у літературі [10–12].

Статистичну обробку даних проводили на персональному комп'ютері з використанням програмних пакетів Statistica 6.0 і MS Excel 2003. Для оцінки відповідності частот генотипів очікуваним значенням при рівновазі Харді — Вайнберга та порівняння частот генотипів й алелів між групами хворих і контролю використовували критерій χ^2 Пірсона та критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса на безперервність (при кількості досліджень менше 10). Асоціацію алелів або генотипів зі схильністю до захворювання оцінювали за величиною відношення шансів (OR). Частоти гаплотипів гена eNOS розраховували з використанням програми EH ("The EH software program (EH)", Rockefeller University, США). Для всіх видів аналізу статистично достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

Частоти генотипів усіх досліджуваних поліморфних варіантів гена eNOS відповідають розподіленню за законом Харді — Вайнберга. Отримані частоти достовірно не відрізнялися від теоретично очікуваних.



**Аналіз розподілення генотипів
за трьома поліморфними варіантами гена eNOS
у жінок із PM3 і групи контролю**

Поліморфізм	Генотип	Розподілення генотипів		Значення р
		Жінки з PM3, n=131	Контрольна група жінок, n=102	
4a/4b	4b/4b	80 (61,07)	66 (64,71)	p>0,05
	4b/4a	43 (32,82)	31 (30,39)	p>0,05
	4a/4a	8 (6,11)	5 (4,90)	p>0,05
G894T	G894G	71 (54,20)	47 (46,08)	p>0,05
	G894T	47 (35,88)	41 (40,20)	p>0,05
	T894T	13 (9,92)	14 (13,73)	p>0,05
T-786C	T-786T	45 (34,35)	36 (35,29)	p>0,05
	T-786C	65 (49,62)	50 (49,02)	p>0,05
	C-786C	21 (16,03)	16 (15,69)	p>0,05

Розподіл частот генотипів й алелів гена eNOS серед групи жінок із PM3 і групою контролю наведено в табл. 1. Достовірної різниці між групами не виявлено.

Результати метааналізу 11 проведених досліджень показують, що поліморфний варіант G894T гена eNOS бере участь у розвитку PM3, зокрема наявність генотипу T894T гена eNOS збільшує ризик розвитку PM3 [9]. Наявність алеля T-786 гена eNOS пов'язана зі зменшенням судинної інвазії при PM3 і є сприятливим прогностичним фактором при цьому захворюванні, тимчасом як наявність алеля C-786 гена eNOS збільшує ризик розвитку PM3 [13; 14].

Згідно з даними літератури, 36 років вважається критичним віком для жінок, оскільки саме з цього віку захворюваність на PM3 починає стрімко зростати. Велика кількість випадків PM3 діагностується у віковій групі жінок від 36 до 54 років. Мабуть, це можна пояснити тим, що приблизно з 36 років починаються інволютивні зміни у структурі молочних залоз, коли залозиста тканина заміщується жировою або фіброзною. Також саме з 36 років у жінки відбувається швидке прогресування зниження фертильності, що спричинене гормональними змінами в організмі: спочатку виникає дисбаланс, а потім і гострий дефіцит статевих гормонів — естрогенів і прогестерону. Враховуючи все вищезазначене, ми розподілили групу дослідження на три підгрупи, відповідно до віку діагностування PM3 (за дебютом захворювання):

- від 18 до 35 років (жінки молодого віку, 18–35);
- від 36 до 54 років (жінки середнього віку, 36–54);
- після 54 років (жінки постменопаузального віку, > 54).

Контрольну групу жінок також було аналогічно розподілено на три підгрупи залежно від віку та проведено оцінку

впливу поліморфізму генів-кандидатів на ризик розвитку PM3 у різних вікових підгрупах.

При аналізі розподілу можливих варіантів генотипів у жінок із PM3 та у контрольній групі для кожної вікової підгрупи було виявлено, що наявність алеля C-786 гена eNOS, який викликає зниження активності eNOS, у жінок від 36 до 54 років збільшує ризик розвитку захворювання на PM3 удвічі [$\chi^2=4,19$; $p=0,041$; OR=2,10 (95 % CI: 1,03–4,32)]. Для жінок, що увійшли до вікових підгруп від 18 до 35 і після 54 років, достовірних відмінностей не виявлено, хоча в літературі відмічено збільшення ризику розвитку PM3 для жінок після 50 років за наявності алеля C-786 та генотипів G894T і T894T гена eNOS. При цьому ризик розвитку PM3 у жінок цього віку ще більше зростає, якщо жінка палить [8; 15].

Наступним завданням нашого дослідження було проаналізувати поєднання генотипів поліморфних варіантів 4a/4b, G894T, T-786C гена eNOS у досліджуваних вікових підгрупах жінок. При аналізі частот поєднань генотипів із 54 можливих варіантів достовірні відмінності були виявлені лише для одного поєднання — eNOS 4b/4b × eNOS G894T, наявність якого знижувала ри-

зик розвитку PM3 у жінок від 36 до 54 років у 3,5 рази [$\chi^2=4,47$; $p=0,0344$; OR=3,68 (95 % CI: 1,23–10,97)]. Для двох інших вікових підгруп жінок (18–35 та > 54) достовірних відмінностей не виявлено.

Ще одним аспектом нашого дослідження було за допомогою програми EH розрахувати частоти гаплотипів для гена eNOS (8 можливих гаплотипів) у досліджуваних вікових підгрупах жінок. При аналізі отриманих частот гаплотипів достовірних відмінностей серед досліджуваних вікових підгруп жінок з PM3 та групи контролю виявлено не було. Хоча група дослідників на чолі з J. Lu показала, що для білих жінок до 55 років наявність гаплотипу C-786/4a/G894 асоційована зі збільшенням ризику розвитку спорадичного PM3 удвічі [8].

Отримані нами дані показали, що частота поліморфних варіантів гена eNOS у загальних і розподілених за віком груп відрізняється, саме тому при проведенні подібних досліджень необхідно враховувати такий важливий параметр, як вік жінки.

Висновки

Таким чином, у результаті проведеного дослідження нами отримано дані про вплив



поліморфних варіантів гена eNOS (4a/4b, T-786C, G894T) на ризик виникнення РМЗ у жінок в Україні. Зокрема, встановлено:

1. Результати для загальних і розподілених за віком груп відрізняються.

2. Наявність алеля С-786 гена eNOS збільшує ризик розвитку РМЗ у віці від 36 до 54 років.

3. Для вікової підгрупи жінок від 36 до 54 років ризик розвитку РМЗ знижується при наявності поєднання генотипів 4b/4bх, G894T гена eNOS.

ЛІТЕРАТУРА

1. Національний канцер-реєстр України: автоматизована система реєстрації онкологічної інформації [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://users.i.kiev.ua>.

2. Rubbo H. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights / H. Rubbo, V. O'Donnell // *Toxicology*. – 2005. – Vol. 228, Is. 2. – P. 305–317.

3. Roles of nitric oxide in tumor growth / D. C. Jenkins, I. G. Charles, L. L. Thomsen [et al.] // *PNAS*. – 1995. – Vol. 92, N 10. – P. 4392–4396.

4. Chien Y. H. Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotide excision repair / Y. H. Chien, D. T. Bau, K. Y. Jan // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2004. – Vol. 36, N 8. – P. 1011–1017.

5. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents / W. Xu, L. Liu, G. C. Smith [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2, N 6. – P. 339–345.

6. Shubhangi A. Nitric oxide and eNOS gene in essential hypertension / A. Shubhangi, D. Nibhriti, S. Kamna // *International journal of collaborative research on internal medicine & public health*. – 2009. – Vol. 1, N 2. – P. 56–71.

7. Exercise training improves muscle vasodilatation in individuals with T786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene / M. V. Negrao, C. R. Alves, G. B. Alves [et al.] // *Physiological Genomics*. – 2010. – Vol. 42A, N 1. – P. 71–77.

8. Promoter polymorphism (-786t>c) in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with risk of sporadic-breast cancer in non-Hispanic white women age younger than 55 years / J. Lu, Q. Wei, M. L. Bondy [et al.] // *Cancer*. – 2010. – Vol. 107, N 9. – P. 2245–2253.

9. Hao Y. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G>T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis / Y. Hao, R. Montiel, Y. Huang // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2010. – Vol. 124, N 3. – P. 809–813.

10. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension / Y. Miyamoto, Y. Saito, N. Kajiyama [et al.] // *Hypertension*. – 1998. – Vol. 32, N 1. – P. 3–8.

11. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran / S. Salimi, M. Firoozrai, I. Nourmohammadi [et al.] // *The Indian Journal of Medical Research*. – 2006. – Vol. 124, N 6. – P. 683–688.

12. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction / S. Nasreen, T. Nabika, H. Shibata [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2002. – Vol. 22, N 4. – P. 602–610.

13. Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T→786C polymorphism of NOS3 gene / G. Ghilardi, M. L. Biondi, F. Cecchini [et al.] // *Nitric Oxide*. – 2003. – Vol. 9, N 2. – P. 118–122.

14. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer / L. A. Hefler, C. Grimm, T. Lantzsch [et al.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2006. – Vol. 98, N 2. – P. 151–155.

15. Relationships between polymorphisms in NOS3 and MPO genes, cigarette smoking and risk of post-menopausal breast cancer / J. Yang, C. B. Ambrosone, C. C. Hong [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 28, N 6. – P. 1247–1253.

REFERENCES

1. Ukrainian National cancer registry: automatic system of cancer information registration [Electronic resource]. – Access mode : <http://users.i.kiev.ua>.

2. Rubbo H., O'Donnell V. Nitric oxide, peroxynitrite and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology* 2005; 228 (2): 305-317.

3. Jenkins D.C., Charles I.G., Thomsen L.L. [et al.]. Roles of nitric oxide in tumor growth. *PNAS* 1995; 92 (10): 4392-4396.

4. Chien Y.H., Bau D.T., Jan K.Y. Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotide excision repair. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 36 (8): 1011-1017.

5. Xu W., Liu L., Smith G.C. [et al.]. Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-

damaging anti-tumour agents. *Nat. Cell Biol* 2000; 2 (6): 339-345.

6. Shubhangi A., Nibhriti D., Kamna S. Nitric oxide and eNOS gene in essential hypertension. *International journal of collaborative research on internal medicine & public health* 2009; 1 (2): 56-71.

7. Negrao M.V., Alves C.R., Alves G.B. [et al.]. Exercise training improves muscle vasodilatation in individuals with T786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene. *Physiological Genomics* 2010; 42A (1): 71-77.

8. Lu J., Wei Q., Bondy M.L. [et al.]. Promoter polymorphism (-786t>c) in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with risk of sporadic-breast cancer in non-Hispanic white women age younger than 55 years. *Cancer* 2010; 107 (9): 2245-2253.

9. Hao Y., Montiel R., Huang Y. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G>T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010; 124 (3): 809-813.

10. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N. [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32 (1): 3-8.

11. Salimi S., Firoozrai M., Nourmohammadi I. [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase gene intron4 VNTR polymorphism in patients with coronary artery disease in Iran. *The Indian Journal of Medical Research* 2006; 124 (6): 683-688.

12. Nasreen S., Nabika T., Shibata H. [et al.]. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 22 (4): 602-610.

13. Ghilardi G., Biondi M.L., Cecchini F. [et al.]. Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T→786C polymorphism of NOS3 gene. *Nitric Oxide* 2003; 9 (2): 118-122.

14. Hefler L.A., Grimm C., Lantzsch T. [et al.]. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2006; 98 (2): 151-155.

15. Yang J., Ambrosone C.B., Hong C.C. [et al.]. Relationships between polymorphisms in NOS3 and MPO genes, cigarette smoking and risk of post-menopausal breast cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28 (6): 1247-1253.

Надійшла 4.02.2013

