

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 575.117.5, 575.113.2

КИПЕНЬ

Вячеслав Николаевич

**РОЛЬ НИЗКО- И СРЕДНЕПЕНЕТРАНТНЫХ ГЕНОВ
В РАЗВИТИИ СПОРАДИЧЕСКОГО
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2018

Научная работа выполнена в УО «Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета

Научный руководитель: **Мельнов Сергей Борисович**
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры экологических
информационных систем УО
«Международный государственный
экологический институт им. А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

Официальные оппоненты: **Кужир Татьяна Дановна**
доктор биологических наук, главный научный
сотрудник лаборатории молекулярных основ
стабильности генома ГНУ «Институт генетики
и цитологии НАН Беларуси»
Державец Лилия Александровна
кандидат биологических наук, заведующий
клинико-диагностической лабораторией ГУ
«Республиканский научно-практический центр
онкологии и медицинской радиологии имени
Н.Н. Александрова»

Оппонирующая УО «Гомельский государственный
организация: медицинский университет»

Защита состоится 21 июня 2018 г. в 14.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» по адресу 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.
Тел.: (+375 17) 284 04 10, факс: (+375 17) 284 19 17, e-mail: O.Orlovskaya@igc.by
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Автореферат разослан « 17 » мая 2018 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
кандидат биологических наук

О.А. Орловская

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой сложное полигенное мультифакторное заболевание, являющееся одним из наиболее распространенных онкозаболеваний в мире. В развитых странах в последние годы наметилась тенденция к уменьшению смертности от данной патологии за счет широкого внедрения ранней диагностики, включая генодиагностику. С другой стороны, наблюдается тенденция роста числа вновь выявленных случаев данного заболевания в странах, где ранее уровень его распространенности был относительно невысоким, что принято связывать с загрязнением окружающей среды, изменением образа жизни, традиционных диет, сексуального поведения и др. [Breast Cancer Association Consortium, 2006; Key et al., 2001; Travis et al., 2010].

Показатель заболеваемости РМЖ в РБ в 2014 году составил 80,1 человек на 100 тыс. женского населения (стандартизированный средний пятилетний показатель СП World – 47,4 человек на 100 тыс. женского населения) [Статистика онкологических заболеваний в РБ (2005–2014) под ред. О. Г. Суконко, 2015]. По состоянию на 2017 г. в структуре онкологической заболеваемости женщин в РБ РМЖ продолжает занимать первое место.

Обычно все случаи РМЖ подразделяют на спорадические (90-95% от всех вновь выявленных случаев) и наследственные (5-10%). В генезе последнего доказана важная роль генов *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBS1*, *MSH(2,3,6)*, *CDH1*, *BRIP* и ряда других, при наличии мутаций пенетрантность которых составляет 80-100%. Кроме того, существует достаточно большая группа генов-модификаторов, существенно влияющих на степень пенетрантности того или иного гена-индуктора [Любченко и др., 2014].

В целом, такое многообразие генетических механизмов свидетельствует об отсутствии единого ведущего механизма и подчеркивает необходимость комплексного подхода, позволяющего выявить «злокачественный профиль», предрасполагающий к возникновению РМЖ.

В настоящее время с помощью полногеномного секвенирования удалось выявить около 120 потенциальных генов-кандидатов для РМЖ. Все эти гены, так или иначе, контролируют важнейшие клеточные функции, вовлеченные в неопластический процесс: контроль клеточного цикла, биотрансформацию ксенобиотиков, клеточную адгезию, миграцию, апоптоз, трансформацию цитоскелета, пролиферацию и др. [Zheng et al., 2009; Easton et al., 2007].

В отношении спорадического РМЖ также до сих пор нет общего мнения относительно ключевых генетических мишеней: предполагается, что именно совокупность факторов, как генетической, так и средовой природы, приводит к развитию данного заболевания [Getz et al., 2007; Teschendorff et al., 2009].

Общепризнанным является тот факт, что суммарный вклад средне- и низкопенетрантных генов может быть сопоставим или даже превышать рассчитанный риск развития того или иного заболевания по сравнению с единичными высокопенетрантными генами [Garcia-Closas et al., 2008]. Отсюда вытекает логичное заключение о том, что одновременный анализ роли большого количества средне- и низкопенетрантных генов в развитии спорадического РМЖ может позволить точнее предсказать индивидуальный риск развития данного заболевания, а учет межгенных ассоциаций позволит выявить наиболее значимые комплексы генов, что существенно упростит скрининговые исследования. Суммируя изложенное выше и опираясь на доказанную роль взаимодействия неаллельных генов в развитии ряда заболеваний человека, можно констатировать, что изучение роли взаимодействий генов-кандидатов представляется наиболее актуальной и приоритетной задачей современной онкологии и генетики человека.

В данной работе основное внимание было сконцентрировано на оценке роли полиморфных вариантов генов низкой и средней пенетрантности *XRCC1*, *XRCC3*, *PALB2*, *TP53*, *ATM*, *HMMR*, *EPHX1*, *NAT1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *ALDH2*, *ADH1B*, *DRD3*, *MTHFR*, *CYP1B1*, *CYP2D6*, *CYP1A1*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *TET1* в генезе РМЖ. С помощью математического моделирования также был проведен анализ совокупного вклада основных риск-ассоциированных полиморфных вариантов этих генов в развитие спорадического РМЖ.

Реальная оценка относительного вклада основных полиморфных вариантов генов-кандидатов, вовлеченных в генез спорадического рака молочной железы, позволит обеспечить не только эффективную профилактику данного заболевания, но и более высокую адресность медицинской помощи, что будет иметь не только социальный, но и прямой экономический эффект.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами, темами. Изучение распространенности полиморфных вариантов и мутаций в генах *TP53*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBS1* и др. среди пациентов с клинически верифицированным диагнозом РМЖ выполнено в рамках ГПНИ «Природно-ресурсный потенциал» по заданию: «Оценить роль неблагоприятных факторов окружающей среды в возникновении прогрессирующих онкологических заболеваний (рак молочной железы), установить клеточные механизмы реализации патологических процессов» (2011–2013 гг., № гос. регистрации 20111112), а также в рамках БРФФИ Б12М-121 «Распространенность мутаций по ключевым генам системы репарации у женщин Республики Беларусь» (2012–2014 гг., № гос. регистрации 20122460).

Цель исследования – оценить вклад в генез спорадического рака молочной железы полиморфных вариантов низко- и среднепенетрантных генов,

ответственных за поддержание стабильности ДНК (системы репарации, контроль клеточного цикла, фолатный цикл, регуляция дофамина, биотрансформация ксенобиотиков, метилирование ДНК).

Задачи исследования:

1. Выявить полиморфные варианты генов низкой и средней пенетрантности: эксцизионной репарации оснований и гомологичной рекомбинации – *PALB2* (p.T1100T, p.R559Q), *XRCC1* (p.Q399R), *XRCC3* (p.T241M); контроля клеточного цикла – *TP53* (p.P72R), *ATM* (p.C49S), *HMMR* (p.V353A); фолатного цикла – *MTHFR* (p.E429A); регуляции дофамина – *DRD3* (g.43693C>T); биотрансформации ксенобиотиков – *EPHX1* (p.Y374S), *GSTP1* (p.I105V), *ALDH2* (p.E457K), *ADH1B* (p.H48R), *NAT2* (p.L161L, p.R197Q), *GSTT1* (null), *CYP1B1* (p.L342V), *CYP2D6* (p.P34S), *CYP1A1* (c.6235T>C, p.I462V), метилирования ДНК – *DNMT1* (g.10168778G>A, p.H97R), *DNMT3A* (g.25512438T>G), *TET1* (g.70391172G>T), – ассоциированные с повышенной вероятностью развития спорадического РМЖ.

2. Оценить роль взаимодействия неаллельных генов систем репарации, контроля клеточного цикла, фолатного цикла, регуляции дофамина, биотрансформации ксенобиотиков и метилирования ДНК в формировании генотипа, ассоциированного с высокой вероятностью развития спорадического РМЖ.

3. Оценить выживаемость пациентов со спорадическим РМЖ в зависимости от генетического профиля исследуемых локусов, а также выявить полиморфные варианты вышеперечисленных генов низкой и средней пенетрантности, ассоциированные с ранним развитием спорадического РМЖ.

Объект исследования – ДНК из биологических образцов (капиллярная или венозная кровь, буккальный эпителий) пациентов с верифицированным диагнозом рак молочной железы и группы сравнения.

Предмет исследования – молекулярно-генетические особенности предрасположенности к развитию спорадического рака молочной железы; полиморфизм генов, ассоциированных с повышенной вероятностью развития спорадического рака молочной железы.

Научная новизна. Впервые дана оценка частоты распространенности генотипов/аллелей для полиморфных вариантов p.T1100T (ген *PALB2*), p.R559Q (ген *PALB2*), p.Q399R (ген *XRCC1*), p.T241M (ген *XRCC3*), p.P72R (ген *TP53*), p.C49S (ген *ATM*), p.V353A (ген *HMMR*), p.Y374S (ген *EPHX1*), p.I105V (ген *GSTP1*), p.E457K (ген *ALDH2*), p.H48R (ген *ADH1B*), g.43693C>T (ген *DRD3*), p.L161L (ген *NAT2*), p.R197Q (ген *NAT2*), *GSTT1* null (ген *GSTT1*), p.L342V (ген *CYP1B1*), p.P34S (ген *CYP2D6*), c.6235T>C (ген *CYP1A1*), p.I462V (ген *CYP1A1*), g.10168778G>A (ген *DNMT1*), p.H97R (ген *DNMT1*), g.25512438T>G (ген *DNMT3A*), g.70391172G>T (ген *TET1*) и p.E429A (ген *MTHFR*) как в группе

пациентов со спорадическим РМЖ, так и в группе сравнения – лица женского пола без отягощенного онкопатологией семейного анамнеза.

Впервые в Республике Беларусь выявлены индивидуальные генетические особенности РМЖ на основе совместного сравнительного анализа частоты распространенности риск-ассоциированных полиморфных вариантов генов, вовлеченных в несколько биохимических каскадов: репарация ДНК, биотрансформация ксенобиотиков, контроль клеточного цикла, метилирование ДНК, одноуглеродный метаболизм (фолатный цикл), регуляция дофамина.

В рамках проведенного анализа показано, что суммарный вклад при расчете вероятности развития РМЖ, выраженный в сбалансированной точности, для трех полиморфных вариантов – р.Т241М (ген *XRCC3*), р.І105V (ген *GSTP1*) и р.Е429А (ген *MTHFR*), – составил $79,04 \pm 2,16\%$, т.е. только на основании результатов генотипирования по данным полиморфным вариантам представляется возможным корректно предсказать до 80% рассчитанных значений отношения шансов при оценке вероятности развития спорадического РМЖ.

Также установлено, что полиморфные варианты – р.Т241М (ген *XRCC3*), р.І105V (ген *GSTP1*), р.Е429А (ген *MTHFR*), g.43693C>Т (ген *DRD3*), – не только имеют важное значение в увеличении вероятности развития РМЖ, но и ассоциированы с ранним развитием заболевания и низкими значениями 10-летней выживаемости.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиморфные варианты генов: систем репарации ДНК р.Р559Q (*PALB2*) – отношение шансов (ОШ) 2,12 ($p=0,002$), р.Q399R (*XRCC1*) – ОШ=2,31 ($p=0,007$), р.Т241М (*XRCC3*) – ОШ=2,48 ($p=0,03$); фолатного цикла р.Е429А (*MTHFR*) – ОШ=1,70 ($p=0,01$); регуляции дофамина g.43693C>Т (*DRD3*) – ОШ=1,51 ($p=0,02$); биотрансформации ксенобиотиков р.І105V (*GSTP1*) – ОШ=3,33 ($p=0,001$), g.42524947C>Т (*CYP2D6*) – ОШ=2,30 ($p=0,003$), с.6235Т>С (*CYP1A1*) – ОШ=2,03 ($p=0,02$); метилирования ДНК g.10168778G>А (*DNMT1*) – ОШ=1,65 ($p=0,04$), – ассоциированы с повышенной вероятностью развития спорадического РМЖ, что позволяет рекомендовать их в качестве маркеров предрасположенности к развитию РМЖ.

2. Комбинации полиморфных вариантов р.Т241М (ген *XRCC3*), р.І105V (ген *GSTP1*) и р.Е429А (ген *MTHFR*) позволяют предсказать до 80% рассчитанных значений отношения шансов при оценке вероятности развития спорадического РМЖ.

3. Полиморфные варианты генов *XRCC3* (р.Т241М) и *DRD3* (g.43693C>Т), ассоциированные с повышенной вероятностью развития спорадического РМЖ, связаны с более ранним возрастом верификации диагноза.

4. Сочетания генотипов по полиморфным вариантам р.Т241М (ген *XRCC3*), р.І105V (ген *GSTP1*) и р.Е429А (ген *MTHFR*) ассоциированы с низкими

значениями 10-летней выживаемости пациентов со sporadическим РМЖ, что указывает на их прогностическую значимость.

Личный вклад соискателя ученой степени. Постановка проблемы, формулировка целей и задач исследования, положений, выносимых на защиту, внедрение в учебный процесс результатов исследования проведены совместно с научным руководителем. Соискателем самостоятельно выполнен анализ специальной литературы и подготовлен аналитический обзор данных в этой области. Самостоятельно выполнены экспериментальные молекулярно-генетические исследования образцов ДНК анализируемых групп, а также статистическая обработка результатов генотипирования с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Самостоятельно проведены анализ и интерпретация полученных результатов, выявлены статистически значимые ассоциации между определенным генетическим профилем и повышенной вероятностью развития РМЖ.

Основные научные результаты изложены в 7 единоличных (из них 2 – соответствующие пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь») и 24 совместных (из них 6 – соответствующие пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь») публикациях. В совместных работах, опубликованных по итогам анализа: полиморфных вариантов в генах систем репарации, личный вклад соискателя составляет не менее 80% [1, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 31]; полиморфных вариантов в генах, ответственных за контроль клеточного, фолатного циклов и регуляцию дофамина – не менее 80% [3, 5, 11, 19, 30]; полиморфных вариантов в генах, ответственных за биотрансформацию ксенобиотиков, включая метаболизм одноатомных спиртов – не менее 75% [2, 16, 17, 21, 23, 24, 25, 29]; полиморфных вариантов в генах, связанных с процессами метилирования ДНК – не менее 75% [22, 26].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на: 17-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пушино, 2013); III International Scientific Conference for young scientists, graduates, master and PhD students «Actual Environmental Problems» (Минск, 2013); 14-й Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI-го века» (Минск, 2014); VI Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Геномика и системная биология» (Звенигород, 2014); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014); X научной конференции НИИ медицинской генетики СО РАН «Генетика человека и патология: проблемы эволюционной медицины» (Томск, 2014); Всероссийской конференции молодых ученых-

онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева, в рамках II форума молодых ученых U-NOVUS «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2015); 15-ой Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2015); Международной научно-практической конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, 2015); XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2016); 16-ой Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2016 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, 2016); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017» (Москва, 2017); IX Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины» (Гомель, 2017); IV Международном симпозиуме, посвященном дню ДНК – 2017, «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2017); Международном симпозиуме по геномике, приуроченном к Году науки в Республике Беларусь (Минск, 2017).

Результаты исследований (методики определения генетического полиморфизма и результаты диссертационного исследования) внедрены в учебный процесс кафедры общей экологии, биологии и экологической генетики УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» БГУ (7 актов о внедрении).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 8 статей объемом 5,09 авторских листа в журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь»; 18 статей в сборниках научных трудов и материалах конференций стран СНГ; 5 тезисов в сборниках международных научно-практических конференций. Общий объем публикаций (31 печатная работа) – 9,27 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 153 страницах печатного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, 4 глав, заключения, библиографического списка, включающего 422 источника (из них 362 – на английском языке). Диссертационная работа содержит 24 рисунка, 14 таблиц, 2 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Формирование групп исследования. Работа выполнена на базе научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики научно-исследовательского сектора УО «Международный государственный

экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ. Сбор биологического материала пациентов, проживающих в г. Минске и Минской области, и выяснение анкетных данных осуществлялись в ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова». В работе сформированы две выборки: 1) пациенты с верифицированным диагнозом РМЖ (*основная выборка*); 2) женщины без наличия случаев РМЖ и/или рака яичников (РЯ) в индивидуальном/семейном анамнезе (*группа сравнения*). Объем основной группы составил 188 женщин, группы сравнения – 185 женщин. Группа сравнения соответствовала по основным демографическим показателям (возраст, этнический состав, социальный статус и др.) выборке пациентов с РМЖ. Сбор биологического материала и анкетных данных проводился с соблюдением всех этических норм после подписания опрашиваемыми пациентами формы информированного согласия.

Молекулярно-генетический анализ. Генетический анализ на наличие мутаций – с.5326_5327insC (*BRCA1*, rs80357906), с.185delAG (*BRCA1*, rs80357783), с.300T>G (*BRCA1*, rs28897672), с.4153delA (*BRCA1*, rs80357711), с.6174delT (*BRCA2*, rs80359550), p.R273C (*TP53*, rs121913343), p.R248W (*TP53*, rs121912651), p.R175H (*TP53*, rs28934578), p.R282W (*TP53*, rs28934574), p.R337H (*TP53*, rs121912664), с.657del5 (*NBS1*, rs587776650), с.1100delC (*CHEK2*, rs555607708), с.1100delC (*CHEK2*, rs555607708), – выполнен в выборке из 188 пациенток с установленным диагнозом РМЖ с возрастной медианой 45,0 лет (25% и 75% – 40,2 и 48,2 лет) и в группе из 185 женщин без злокачественных новообразований молочной железы и яичников в анамнезе, возрастная медиана – 43,6 лет (25% и 75% – 38,2 и 48,5 лет). Используются методы – анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP), полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), аллель-специфическая ПЦР (АС-ПЦР).

Анализ на наличие мутаций, определяемых с помощью методов SSCP (для мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* и *TP53*) или АС-ПЦР (для мутаций в гене *CHEK2*), проводился с использованием наборов OneTaq® DNA Polymerase (New England Biolabs, США). В случае выявления мутаций с.5238insC (*BRCA1*), p.R273C (*TP53*) и с.1100delC (*CHEK2*) проводилась дополнительная процедура по секвенированию исследуемых образцов на приборе Genetic Analyzer 3130 с использованием набора для секвенирования «BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США).

Определение генотипов по однонуклеотидным полиморфным вариантам (ОНП) следующих генов: *PALB2* (rs45516100, rs152451), *XRCC1* (rs25487), *XRCC3* (rs861539), *TP53* (rs1042522), *ATM* (rs1800054), *HMMR* (rs299290), *MTHFR* (rs1801131) *DRD3* (rs167770) *EPHX1* (rs72549341) *GSTP1* (rs1695) *ALDH2* (rs671), *ADH1B* (rs1229984) *NAT2* (rs1799929, rs1799930), *CYP1B1* (rs1056836) *CYP2D6* (rs1065852) *CYP1A1* (rs4646903, rs1048943), *DNMT1* (rs2162560, rs16999593), *DNMT3a* (rs12999687), *TET1* (rs7907322), – выполнено методом ПЦР-ПДРФ с

использованием эндонуклеаз рестрикции фирмы NEB (США). Генотипы для полиморфизма «null» гена *GSTT1* определяли методом АС-ПЦР.

Статистический анализ данных. Для сравнения результатов анализа генотипирования в исследуемых группах использовали точный двусторонний критерий Фишера при множественных сравнениях (больше двух) или при абсолютном количестве образцов в анализируемой группе менее 5.

Для качественных данных определяли частоты встречаемости в процентах (%), различия определяли по методу χ^2 . Уровень статистической значимости p при множественных сравнениях вычислялся экспериментально для каждого конкретного случая (сравнения) в процессе моделирования в пакете SPSS v.20.0. Использовали точный критерий Фишера, основанный на пермутации (permutation). Анализ ассоциации генотипов с вероятностью развития заболевания проводился путем вычисления показателя отношения шансов (ОШ).

Количественные данные обрабатывались методом вариационной статистики. Для сравнения количественных данных после проверки на гомоскедастичность (тест Левена) и нормальность распределения (критерий согласия Колмогорова) использовали метод дисперсионного анализа – ANOVA.

Анализ межгенных взаимодействий проводился методом многофакторного сокращения размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) с использованием размещенного в открытом доступе программного обеспечения MDR v.3.0.2. Для оценки функции выживаемости использовали процедуру Каплана-Мейера. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США) и SPSS v.20.0 (IBM, США).

Результаты исследования

Формирование основной группы исследования. Первоначально основную группу исследования составила выборка пациентов с РМЖ – 188 пациентов. Из данной выборки нами были исключены пациенты с клиническими признаками наследственного РМЖ, для которых было показано: 1) наличие основных клинически значимых мутаций в генах *BRCA1* (с.5238insC, с.185delAG, с.300T>G, с.4153delA), *BRCA2* (с.6174delT), *TP53* (р.Р273С, р.Р248W, р.Р175Н, р.Р282W, р.Р337Н), *CHEK2* (с.1100delC, с.IVS2+1G>A) и *NBS1* (с.657del5); 2) наличие в личном анамнезе случаев билатеральных (как синхронных, так и метакронных) форм РМЖ; 3) раннее развитие заболевания.

Нами было выявлено 6 мутаций: одна делеция в гене *CHEK2* – с.1100delC; одна делеция в гене *NBS1* – с.657del5; три миссенс-варианта в гене *TP53* – р.Р273С (1 случай), р.Р282W (1 случай) и р.Р337Н (1 случай); одна инсерция в гене *BRCA1* – с.5238insC. Пациенты с этими мутациями были исключены из основной группы. Кроме того, из основной группы также были исключены 11

случаев билатеральных опухолей молочной железы (3 синхронных и 9 метасинхронных), а также 2 случая РМЖ с ранним развитием заболевания: возраст верификации диагноза – 24 и 25 лет. Таким образом, окончательный объем выборки пациенток со спорадическим РМЖ составил 169 человек.

Частота встречаемости генотипов и аллелей по исследуемым полиморфным вариантам в основной группе и группе сравнения. Были определены частоты распространенности генотипов и аллелей по полиморфным вариантам исследованных генов, вовлеченных в следующие важные клеточные процессы: репарация ДНК, контроль клеточного цикла, фолатный цикл, регуляция дофамина, биотрансформация ксенобиотиков, метаболизм одноатомных спиртов, метилирование ДНК, – в выборке пациентов со спорадическим РМЖ и в группе сравнения.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что статистически значимые различия по частоте распространенности генотипов/аллелей в основной группе и группе сравнения были выявлены для следующих полиморфных вариантов: p.R559Q (*PALB2*), p.Q399R (*XRCC1*), p.T241M (*XRCC3*), p.E429A (*MTHFR*), p.I105V (*GSTP1*), c.43693C>T (*DRD3*), g.42524947C>T (*CYP2D6*), c.6235T>C (*CYP1A1*) и g.10168778G>A (*DNMT1*). Для остальных полиморфных локусов статистически значимых различий между группами обнаружено не было. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Распределение частот генотипов и аллелей исследованных локусов между группой пациентов со спорадическим РМЖ (169 чел.) и группой сравнения (185 чел.)

Ген/ полиморфизм (rs)	Основная группа, чел. (частота)	Группа сравнения, чел. (частота)	Уровень значимости (p)	ОИШ (95% ДИ)
<i>PALB2</i> p.R559Q (rs152451)				
GG	1 (0,006)	1 (0,005)	0,007	1,10 (0,07-17,7)
AG	34 (0,201)	65 (0,351)		0,46 (0,29-0,75)
AA	134 (0,793)	119 (0,643)		2,12 (1,32-3,43)
аллель G	(0,107)	(0,181)	0,005	0,54 (0,35-0,83)
аллель A	(0,893)	(0,819)		1,85 (1,20-2,87)
<i>XRCC1</i> p.Q399R (rs25487)				
AA	17 (0,101)	38 (0,205)	0,004	0,43 (0,23-0,80)
AG	98 (0,580)	79 (0,427)		1,85 (1,21-2,82)
GG	54 (0,320)	68 (0,368)		0,81 (0,52-1,25)
аллель A	(0,391)	(0,419)	0,44	0,89 (0,66-1,20)
аллель G	(0,609)	(0,581)		1,13 (0,83-1,52)

Продолжение таблицы 1

Ген/ полиморфизм (rs)	Основная группа, чел. (частота)	Группа сравнения, чел. (частота)	Уровень значимости (p)	ОШ (95% ДИ)
<i>XRCC3</i> p.T241M (rs861539)				
CC	86 (0,509)	82 (0,443)	0,03	1,30 (0,86-1,98)
CT	68 (0,402)	96 (0,519)		0,62 (0,41-0,85)
TT	15 (0,089)	7 (0,038)		2,48 (1,02-6,23)
аллель С	(0,710)	(0,703)	0,83	1,04 (0,75-1,43)
аллель Т	(0,290)	(0,297)		0,97 (0,70-1,33)
<i>MTHFR</i> p.E429A (rs1801131)				
AA	84 (0,497)	68 (0,368)	0,04	1,70 (1,11-2,60)
AC	71 (0,420)	102 (0,551)		0,59 (0,39-0,90)
CC	14 (0,083)	15 (0,081)		1,02 (0,48-2,19)
аллель А	(0,707)	(0,643)	0,07	1,34 (0,98-1,84)
аллель С	(0,293)	(0,357)		0,75 (0,54-1,02)
<i>GSTP1</i> p.I105V (rs1695)				
AA	45 (0,266)	83 (0,449)	<0,001	0,45 (0,29-0,70)
AG	97 (0,574)	92 (0,497)		1,36 (0,90-2,07)
GG	27 (0,160)	10 (0,054)		3,33 (1,56-7,10)
аллель А	(0,553)	(0,697)	<0,001	0,54 (0,39-0,73)
аллель G	(0,447)	(0,303)		1,86 (1,37-2,53)
<i>DRD3</i> g.43693C>T (rs167770)				
AA	108 (0,639)	100 (0,541)	0,06	1,50 (0,98-2,31)
AG	56 (0,331)	71 (0,384)		0,80 (0,51-1,23)
GG	5 (0,030)	14 (0,076)		0,37 (0,13-1,06)
аллель А	(0,805)	(0,732)	0,02	1,51 (1,06-2,14)
аллель G	(0,195)	(0,268)		0,66 (0,47-0,95)
<i>CYP2D6</i> g.42524947C>T (rs1065852)				
TT	40 (0,237)	22 (0,119)	0,003	2,30 (1,30-4,06)
TC	62 (0,367)	62 (0,335)		1,15 (0,74-1,78)
CC	67 (0,396)	101 (0,546)		0,55 (0,36-0,83)
аллель Т	(0,420)	(0,286)	<0,001	1,80 (1,32-2,47)
аллель С	(0,580)	(0,714)		0,55 (0,41-0,76)
<i>CYP1A1</i> c.6235T>C (rs4646903)				
CC	-	1 (0,005)	0,06	0,36 (0,01-8,97)
CT	18 (0,107)	35 (0,189)		0,51 (0,28-0,94)
TT	151 (0,893)	149 (0,805)		2,03 (1,10-3,73)
аллель С	(0,053)	(0,100)	0,02	0,51 (0,28-0,91)
аллель Т	(0,947)	(0,900)		1,98 (1,10-3,54)
<i>DNMT1</i> g.10168778G>A (rs2162560)				
AA	35 (0,207)	57 (0,308)	0,04	0,59 (0,36-0,95)
AG	87 (0,515)	93 (0,503)		1,05 (0,69-1,59)
GG	47 (0,278)	35 (0,189)		1,65 (1,01-2,72)
аллель А	(0,464)	(0,559)	0,01	0,68 (0,51-0,92)
аллель G	(0,536)	(0,441)		1,46 (1,09-1,97)

Выявление генотипов и аллелей, повышающих вероятность развития рака молочной железы. Были определены генотипы/аллели, ассоциированные с

повышенной вероятностью развития РМЖ, для перечисленных выше ОНП (таблица 1). В отношении полиморфизма p.R559Q (*PALB2*) риск-ассоциированным генотипом оказался А/А – ОШ=2,12 (95% ДИ=[1,32-3,43], p=0,007. Для полиморфизма p.Q399R (*XRCC1*) – генотип А/Г, ОШ=1,85 (95% ДИ=[1,21-2,82], p=0,004). Для ОНП p.T241M (*XRCC3*) генотипом, влияющим на повышение вероятности развития РМЖ, оказался Т/Т – ОШ=2,48 (95% ДИ=[1,02-6,23], p=0,03). Для полиморфизма p.E429A (*MTHFR*) было показано, что наличие генотипа А/А способно статистически значимо повысить вероятность развития спорадического РМЖ – ОШ=1,70 (95% ДИ=[1,11-2,60], p=0,01). Для полиморфизма p.I105V (*GSTP1*) риск-ассоциированным генотипом являлся G/G – ОШ=3,33 (95% ДИ=[1,56-7,10], p<0,001), аллелем – G, ОШ=1,86 (95% ДИ=[1,37-2,53], p<0,001). Для ОНП g.43693C>T (*DRD3*) был определен риск-ассоциированный аллель – А (ОШ=1,51, 95% ДИ=[1,06-2,14], p=0,02). В отношении ОНП g.42524947C>T (*CYP2D6*) риск-ассоциированным генотипом являлся Т/Т – ОШ=2,30 (95% ДИ=[1,30-4,06], p=0,003), аллелем – Т, ОШ=1,80 (95% ДИ=[1,32-2,47], p=0,004). Для полиморфизма c.6235T>C (*CYP1A1*) генотипом, статистически значимо повышающим вероятность развития РМЖ, являлся Т/Т – ОШ=2,03 (95% ДИ=[1,10-3,73], p=0,02), аллелем – соответственно Т, ОШ=2,98 (95% ДИ=[1,10-3,54], p=0,02). И для ОНП g.10168778G>A (ген *DNMT1*) генотипом, ассоциированным с повышенной вероятностью развития РМЖ, оказался G/G – ОШ=1,65 (95% ДИ=[1,01-2,72], p=0,01), аллелем – G, ОШ=1,46 (95% ДИ=[1,09-1,97], p=0,01).

Связь данных генотипирования с возрастом постановки диагноза рак молочной железы. С использованием дисперсионного анализа (ANOVA) были определены значения возраста верификации диагноза в зависимости от конкретного генотипа.

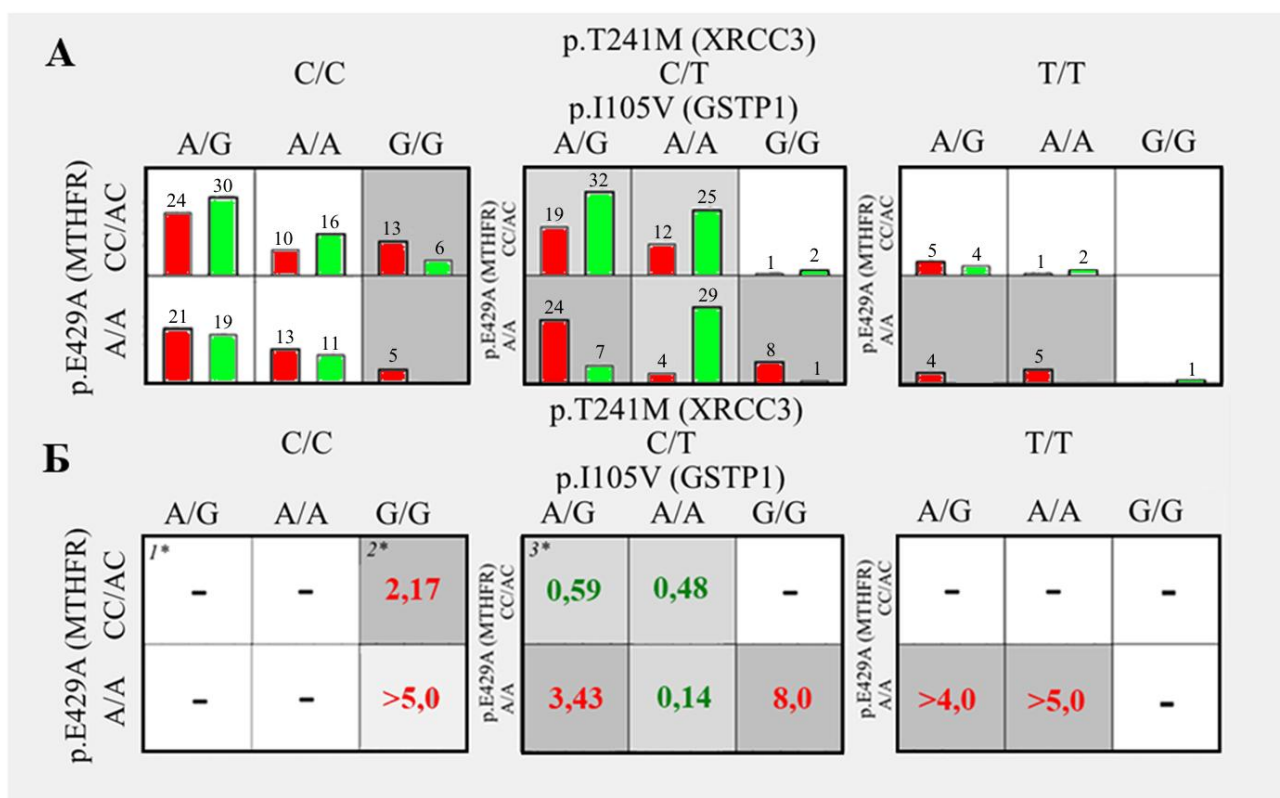
Для пациентов с РМЖ с генотипом Т/Т (минорная аллель Т) по полиморфизму p.T241M (ген *XRCC3*) рассчитанные значения составили 40,53±5,01 года, для пациентов с генотипами СС/СТ – 44,06±5,52 года, p=0,018.

Для ОНП g.43693C>T (ген *DRD3*) средний возраст постановки диагноза РМЖ для пациентов с генотипом G/G более чем на 5 лет меньше, чем для пациентов с генотипами АА/АГ – 38,30±5,65 года и 43,91±5,48 года соответственно, p=0,026.

Анализ межгенных взаимодействий. Построение предсказательных моделей риска развития рака молочной железы. На основании проведенного анализа нами была сформирована стратегия, которая позволяла дифференцировать совокупный вклад полиморфных вариантов среди исследуемых, для которых при расчете риска развития РМЖ было установлено значение ОШ (как >1 – неблагоприятный эффект, так и <1 – протективный эффект) при p<0,05.

С учетом представленных выше результатов, в модель, ориентированную на выявление наиболее значимого комплекса полиморфных вариантов изученных генов, модифицирующих риск развития sporadического РМЖ, были включены следующие ОНП: p.R559Q (*PALB2*), p.Q399R (*XRCC1*), p.T241M (*XRCC3*) – блок генов, вовлеченных в репарационные пути; p.I105V (*GSTP1*), g.43693C>T (*DRD3*), g.42524947C>T (*CYP2D6*), c.6235T>C (*CYP1A1*) – метаболизм ксенобиотиков; p.E429A (*MTHFR*) – фолатный цикл; g.10168778G>A (*DNMT1*) – метилирование ДНК.

С использованием программы MDR 3.0.2 был проведен анализ межгенных взаимодействий для перечисленных генов. В результате проведенного моделирования была отобрана модель с наилучшими показателями чувствительности и специфичности (рисунок 1).



А – распределение генотипов исследованных локусов между группой пациентов со sporadическим РМЖ (169 чел.) и группой сравнения (185 чел.),
 (■) – абсолютное количество пациентов со sporadическим РМЖ
 (■) – абсолютное количество человек из группы сравнения; **Б** – отношение шансов для комбинации генотипов в рамках моделирования эффекта межгенных взаимодействий: 1* (□) – различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы (нейтральный эффект); 2* (■) – сочетание генотипов, связанное с высоким риском развития РМЖ (риск-ассоциированный эффект); 3* (■) – сочетание генотипов, связанное с низким риском развития РМЖ (протективный эффект)

Рисунок 1. – Моделирование эффекта межгенных взаимодействий для полиморфных вариантов, статистически значимо увеличивающих вероятность развития РМЖ

Данная трехлокусная модель, включающая: «p.T241M (ген *XRCC3*), генотипы CC/CT/TT // p.I105V (ген *GSTP1*), генотипы AA/AG/GG // p.E429A (ген *MTHFR*), генотипы AA/AC-CC», – характеризовалась следующими параметрами: воспроизводимость – 100% (100/100), сбалансированная точность предсказания – $79,04 \pm 2,16\%$ ($p < 0,001$), чувствительность – $78,67 \pm 2,18\%$, специфичность – $79,41 \pm 2,15\%$.

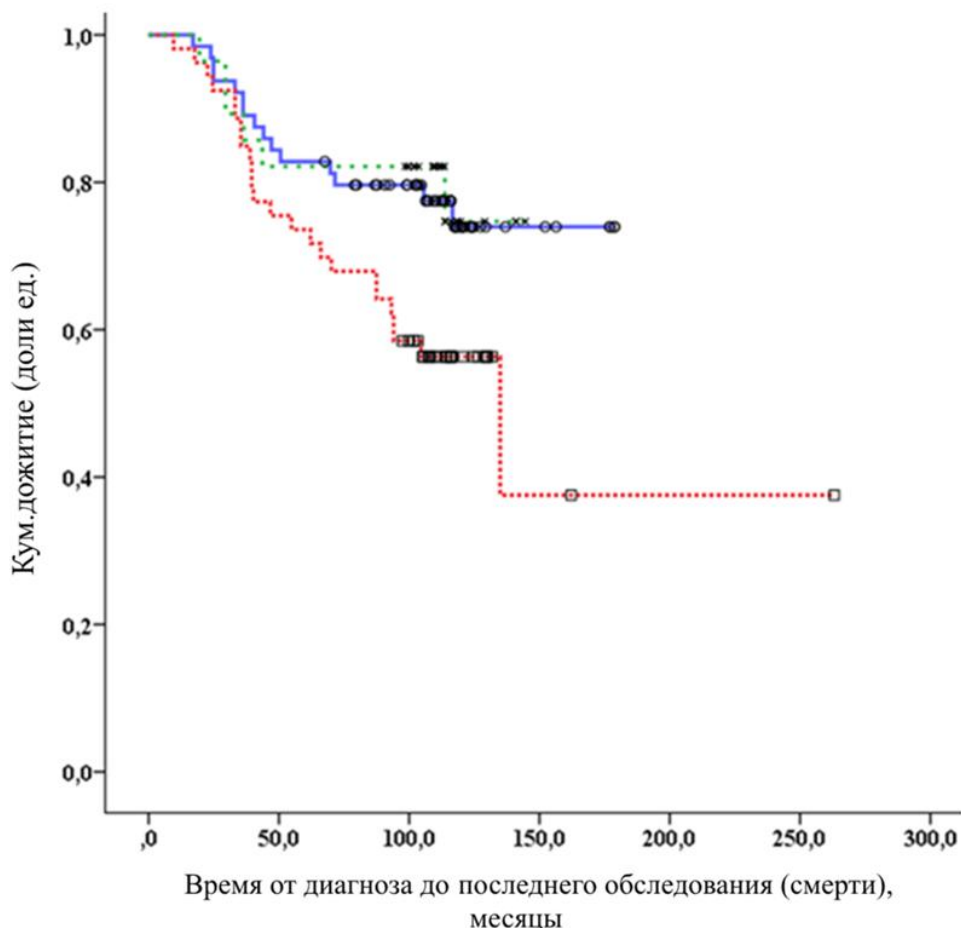
Это исследование показывает, что суммарный эффект данных полиморфных вариантов составил $79,04 \pm 2,16\%$, т.е. только на основании результатов генотипирования по ОНП p.T241M (*XRCC3*), p.I105V (*GSTP1*) и p.E429A (*MTHFR*) представляется возможным правильно предсказать до 80% рассчитанных значений ОШ в возрастании вероятности развития спорадического РМЖ среди пациентов в рамках данного исследования.

Соответственно, генетическим профилем (сочетанием генотипов), приводящим к значительному возрастанию вероятности развития спорадического РМЖ являются: наличие аллели G по ОНП p.I105V (*GSTP1*), аллели T по ОНП p.T241M (*XRCC3*) и генотипа A/A по ОНП p.E429A (*MTHFR*).

Таким образом, нами было показано, что полиморфные варианты в генах фолатного цикла (p.E429A, ген *MTHFR*), биотрансформации ксенобиотиков (p.I105V, ген *GSTP1*) и репарации ДНК (p.T241M, ген *XRCC3*) оказывают наибольший вклад в суммарный расчетный показатель отношения шансов при оценке повышенной вероятности развития спорадического РМЖ из числа исследуемых в данной работе полиморфных вариантов генов.

Анализ выживаемости пациентов с раком молочной железы в зависимости от генетического профиля. В результате было установлено, что доля пациентов с риск-ассоциированным профилем по ОНП p.T241M (*XRCC3*), p.I105V (*GSTP1*), p.E429A (*MTHFR*), умерших от основного заболевания, значительно превосходит таковую для пациентов, имеющих генетический профиль, обладающий протективным эффектом, $p = 0,019$. Анализ выживаемости с использованием кривых Каплан-Мейера (Kaplan-Meier estimator) подтвердил сделанные заключения, Log Rank (Mantel Cox) $p = 0,026$ (рисунок 2).

Проведенный статистический анализ показал, что $45,3\%$ (24/53) пациентов со спорадическим РМЖ, имеющих риск-ассоциированный профиль по ОНП p.T241M (*XRCC3*), p.I105V (*GSTP1*), p.E429A (*MTHFR*), умерли от основного заболевания. Для пациентов без риск-ассоциированного сочетания генотипов или с генетическим профилем, обладающим протективным эффектом в отношении вероятности развития заболевания, летальный исход от основного заболевания был отмечен лишь для $23,4\%$ (15/64) и $21,4\%$ (6/28) соответственно (см. примечания к рисунку 1).



(■) – кривая дожития для пациентов со спорадическим РМЖ с генетическим профилем, не связанным с риском развития РМЖ; (■) – кривая дожития для пациентов со спорадическим РМЖ с генетическим профилем, имеющим протективный эффект в отношении возникновения заболевания; (■) – кривая дожития для пациентов со спорадическим РМЖ с генетическим профилем, ассоциированным с повышенной вероятностью развития заболевания

Рисунок 2. – Кривая дожития Каплан-Мейера для пациентов со спорадическим РМЖ в зависимости от генетического профиля по ОНП р.Т241М (ген *XRCC3*), р.І105V (ген *GSTP1*), р.Е429А (ген *MTHFR*)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

Таким образом, на основании полученных нами результатов в процессе выполнения диссертационного исследования, могут быть сформулированы следующие выводы:

1. Установлено, что полиморфные варианты генов систем репарации ДНК – р.Р559Q (ген *PALB2*), р.Q399R (ген *XRCC1*), р.Т241М (ген *XRCC3*); фолатного цикла р.Е429А (ген *MTHFR*); регуляции дофамина с.43693С>Т (ген *DRD3*); биотрансформации ксенобиотиков – р.І105V (ген *GSTP1*), г.42524947С>Т (ген *CYP2D6*), с.6235Т>С (ген *CYP1A1*); и метилирования ДНК г.10168778G>А (ген *DNMT1*), – ассоциированы с повышенной вероятностью

развития спорадического РМЖ. Для полиморфизма p.R559Q (ген *PALB2*) с повышенной вероятностью развития РМЖ ассоциирован генотип А/А – ОШ=2,12, p=0,007; для полиморфизма p.Q399R (ген *XRCC1*) – А/Г, ОШ=1,85, p=0,004; для p.T241M (ген *XRCC3*) – Т/Т, ОШ=2,48, p=0,03; для p.E429A (ген *MTHFR*) – А/А, ОШ=1,70, p=0,01; для g.43693C>T (ген *DRD3*) – аллель А, ОШ=1,51, p=0,02; для p.I105V (ген *GSTP1*) – генотип G/G, ОШ=3,33, p<0,001 и аллель G, ОШ=1,86, p<0,001; для g.42524947C>T (ген *CYP2D6*) – генотип Т/Т, ОШ=2,30, p=0,003 и аллель Т, ОШ=1,80, p<0,001; для с.6235T>C (ген *CYP1A1*) – генотип Т/Т, ОШ=2,03, p=0,02 и аллель Т, ОШ=1,98, p=0,02; для g.10168778G>A (ген *DNMT1*) – генотип G/G, ОШ=1,65, p=0,04 и аллель G, ОШ=1,46, p=0,01 [1-3, 5, 6, 9-13, 16-27, 29].

2. Суммарный вклад при расчете вероятности развития РМЖ для трех полиморфных вариантов – p.T241M (ген *XRCC3*), p.I105V (ген *GSTP1*) и p.E429A (ген *MTHFR*), – составил $79,04 \pm 2,16\%$, т.е. только на основании результатов генотипирования по данным полиморфным вариантам возможно корректно предсказать до 80% рассчитанных значений отношений шансов и определить вероятность развития спорадического РМЖ [4, 8, 14, 28];

3. Наличие генотипа Т/Т для полиморфизма p.T241M (ген *XRCC3*) и генотипа G/G для полиморфизма g.43693C>T (ген *DRD3*), ассоциированных с повышенной вероятностью развития РМЖ, статистически значимо связано с более ранним возрастом верификации диагноза РМЖ. Для пациентов с РМЖ с генотипом Т/Т (минорная аллель Т) по полиморфизму p.T241M (ген *XRCC3*) рассчитанные значения возраста верификации диагноза составили $40,53 \pm 5,01$ года, для пациентов с генотипами СС/СТ – $44,06 \pm 5,52$ года, p=0,018. Для полиморфизма g.43693C>T (ген *DRD3*) средний возраст постановки диагноза РМЖ для пациентов с генотипом G/G оказался в среднем на 5 лет меньше, чем для пациентов с генотипами АА/АГ – $38,30 \pm 5,65$ и $43,91 \pm 5,48$ года соответственно, p=0,026 [7, 8, 15, 30].

4. Смертность от основного заболевания в течение 10 лет среди пациентов с РМЖ, носителей комбинаций генотипов по локусам p.T241M (ген *XRCC3*), p.I105V (ген *GSTP1*), p.E429A (ген *MTHFR*), ассоциированных с повышенной вероятностью развития РМЖ, вдвое превосходит таковую для пациентов, для которых совокупность генотипов не была статистически значимо связана с вероятностью развития заболевания или не приводила к ее повышению – 45,3% (24/53), 23,4% (15/64) и 21,4% (6/28) соответственно, p=0,019 [8, 31].

5. Установлено, что некоторые полиморфные варианты низко- и среднепетрантных генов – *PALB2* (p.R559Q), *XRCC1* (p.Q399R), *XRCC3* (p.T241M), *GSTP1* (p.I105V), *MTHFR* (p.E429A), *DRD3* (g.43693C>T) *CYP2D6* (g.42524947C>T), *CYP1A1* (с.6235T>C) *DNMT1* (g.10168778G>A), – имеют не

только важное значение в увеличении вероятности развития РМЖ, но и ассоциированы с ранним развитием заболевания (гены *XRCC3* и *DRD3*) и низкими значениями выживаемости (гены *XRCC3*, *GSTP1*, *MTHFR*), что указывает на их прогностическую значимость [1, 2, 5, 6, 8, 15, 18, 19-23, 30, 31].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Результаты исследования внедрены в учебный процесс УО «Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова» БГУ (7 актов внедрения) и рекомендуются к использованию при подготовке студентов высших учебных заведений биологического и медицинского профиля, а также в учреждениях здравоохранения и академических лабораториях молекулярно-генетической направленности при формировании групп риска рака молочной железы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Публикации, соответствующие пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь»

1. **Кипень, В. Н.** Роль генов *XRCC1*, *XRCC3* и *PALB2* в генезе рака молочной железы / **В. Н. Кипень**, Е. В. Снытков, С. Б. Мельнов // Экологический вестник. – 2015. – №1 (31). – С. 57–63.
2. Вклад полиморфных вариантов генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *NAT2*, *EPHX1*) в генез рака молочной железы / **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов, Р. М. Смолякова, Н. Н. Антоненкова // Онкологический журнал. – 2015. – Т. 9, №1 (33). – С. 49–55.
3. **Кипень, В. Н.** Распространенность мутаций в генах *TP53*, *ATM*, *NBS1*, *CHEK2* при ранних формах рака молочной железы у пациенток из Республики Беларусь / **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов, Р.М. Смолякова // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Сер. прыродазнаўчых навук. – 2015. – №2. – С. 19–24.
4. **Кипень, В. Н.** Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к спорадическому раку молочной железы (на примере генов *XRCC1*, *XRCC3* и *PALB2*) / **В. Н. Кипень** // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2015. – Т. 10, Ч. 1. – С. 146–152.
5. **Кипень, В. Н.** Вклад полиморфных вариантов р.Р72R (*TP53*) и р.У353А (*HMMR*) в генез спорадических случаев рака молочной железы / **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов, Р. М. Смолякова // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – №4 (46). – С.40–46.

6. **Kipen, V. N.** The role of the *XRCC1*, *XRCC3*, and *PALB2* genes in the genesis of sporadic breast cancer / **V. N. Kipen**, S. B. Melnov, R. M. Smolyakova // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2017. – Vol. 7, № 6. – P. 705–711.

7. Молекулярно-гистологическая характеристика опухолей молочной железы у женщин из кыргызской популяции – вклад генов *TP53*, *XRCC1* и *MDM2* / Ж. Т. Исакова, **В. Н. Кипень**, Семетей кызы Айгул, Э. Т. Талайбекова, Э. К. Макимбетов, Н. М. Алдашева // Медицинская генетика. – 2017. – № 6. – С. 36–42.

8. **Kipen, V. N.** The role of low-penetrance alleles in predisposing the development of sporadic breast cancer / **V. N. Kipen** // Russian Journal of Genetics. – 2017. – Vol. 53, № 7. – P. 804–808.

Материалы конференций

9. **Kipen, V.** Analysis of ARG399GLN haplotype polymorphism in the gene *XRCC1* with risk of breast cancer / E. Snytkov, **V. Kipen** // Actual Environmental Problems : proceedings of the III International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students, Minsk, 21–22 nov. 2013 / Establishment of Education «International Sakharov Environmental University» ; the general editorship S. S. Poznyak. – Minsk, 2013. – P. 49–50.

10. **Kipen, V.** Study of the frequency of occurrence MET241THR polymorphism in the gene *XRCC3* among patients with breast cancer in Belarus / E. Snytkov, **V. Kipen** // Actual Environmental Problems : proceedings of the III International Scientific Conference of young scientists, graduates, master and PhD students, Minsk, 21–22 nov. 2013 / Establishment of Education «International Sakharov Environmental University» ; the general editorship S. S. Poznyak. – Minsk, 2013. – P. 50–51.

11. **Кипень, В. Н.** Мутации в генах *TP53*, *ATM*, *NBS1*, *CHEK2* при ранних формах рака молочной железы у пациенток из Республики Беларусь / **В. Н. Кипень**, Е. В. Снытков, С. Б. Мельнов // Молекулярная диагностика – 2014 : сборник трудов VIII Всероссийской научно–практической конференции с международным участием, Москва, 18–20 марта 2014 г. / ФБУН «Центральный научно–исследовательский институт эпидемиологии» ; под ред. В. И. Покровского. – Москва, 2014. – С. 106–107.

12. **Кипень, В. Н.** Роль генов репарационных систем: *XRCC1* (эксцизионная репарация оснований), *XRCC3* и *PALB2* (гомологичная рекомбинация), – в генезе рака молочной железы у пациенток из Республики Беларусь / **В. Н. Кипень**, Е. В. Снытков, С. Б. Мельнов // Молекулярная диагностика – 2014 : сборник трудов VIII Всероссийской научно–практической конференции с международным участием, Москва, 18–20 марта 2014 г. / ФБУН

«Центральный научно–исследовательский институт эпидемиологии» ; под ред. В. И. Покровского. – Москва, 2014. – С. 107–109.

13. **Кипень, В. Н.** Влияние аллели Arg399Gln гена *XRCC1* на риск возникновения рака молочной железы / Е. В. Снытков, **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI-го века : материалы 14–ой Международной научной конференции, Минск, 29–30 мая 2014 г. / УО «Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова» ; под ред. В. И. Дуная, С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск, 2014. – С.122.

14. **Кипень, В. Н.** Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к раку молочной железы (на примере ключевых генов репарационных систем) / **В. Н. Кипень** // Генетика человека и патология: проблемы эволюционной медицины : сборник научных трудов X научной конференции НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск, 15–17 октября 2014 г. / НИИ медицинской генетики СО РАМН ; под ред. В. А. Степанова. – Томск, 2014. – С. 115–120.

15. **Кипень, В. Н.** Молекулярно–гистологическая характеристика опухолей молочной железы – вклад генов *XRCC1*, *XRCC3* и *PALB2* / **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов // Генетика человека и патология: проблемы эволюционной медицины : сборник научных трудов X научной конференции НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск, 15–17 октября 2014 г. / НИИ медицинской генетики СО РАМН ; под ред. В. А. Степанова. – Томск, 2014. – С.120–127.

16. **Кипень, В. Н.** Частота распространенности полиморфных вариантов p.E457K гена *ALDH2* и p.H48R (rs1229984) гена *ADH1B* среди пациентов с раком молочной железы / **В. Н. Кипень**, Е. В. Снытков, С. Б. Мельнов // Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века : материалы 15–ой Международной научной конференции, Минск, 21–22 мая 2015 г. / УО «Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова» ; под ред. С. С. Позняка и Н. А. Лысухо. – Минск, 2015.– С. 124–125.

17. **Кипень, В. Н.** Частота распространенности полиморфизма p.Y374S гена *EPHX1* среди пациентов с раком молочной железы / **В. Н. Кипень**, Е. В. Снытков, С. Б. Мельнов // Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века : материалы 15–ой Международной научной конференции, Минск, 21–22 мая 2015 г. / УО «Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова» ; под ред. С. С. Позняка и Н. А. Лысухо. – Минск, 2015. – С. 125–126.

18. **Кипень, В. Н.** Связь полиморфизма p.I105V (rs1695) гена *GSTP1* с риском развития рака молочной железы у пациентов из Республики Беларусь / **В. Н. Кипень** // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии :

материалы Всероссийской конференции молодых ученых–онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева в рамках II форума молодых ученых U–NOVUS, Томск, 22 мая 2015 г. / ФГБНУ «Томский научно–исследовательский институт онкологии» ; под ред. В. С. Сумарокой и Е. В. Лукиной. – Томск, 2015. – С. 45.

19. Снытков, Е. В. Ассоциация полиморфизма g.43693C>T гена *DRD3* с риском развития рака молочной железы / Е. В. Снытков, **В. Н. Кипень** // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии : материалы Всероссийской конференции молодых ученых–онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева в рамках II форума молодых ученых U–NOVUS, Томск, 22 мая 2015 г. / ФГБНУ «Томский научно–исследовательский институт онкологии» ; под ред. В. С. Сумарокой и Е. В. Лукиной. – Томск, 2015. – С. 75.

20. **Кипень, В. Н.** Роль полиморфизма p.E429A (rs1801131) гена *MTHFR* в увеличении риска развития спорадического рака молочной железы / **В. Н. Кипень** // Молекулярная онкология: итоги и перспективы : материалы конференции, Москва, 16–17 декабря 2015 г. / Научно–исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «РОИЦ им. н.н. Блохина» ; редкол.: М. А. Красильников (гл. ред.) [и др.]. – Москва, 2015. – С. 46.

21. **Кипень, В. Н.** Частота распространенности полиморфных вариантов c.6235T>C (MspI) гена *CYP1A1* среди пациентов со спорадическим раком молочной железы из Республики Беларусь / **В. Н. Кипень**, Н. С. Смольник, Ю. В. Малиновская // Сахаровские чтения 2016 года: экологические проблемы XXI века : материалы 16–ой Международной научной конференции, Минск, 19–20 мая 2016 г. / УО «Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова» БГУ ; под ред. С. А. Маскевича, С. С. Позняка, Н. А. Лысухо. – Минск, 2016. – С. 76–77.

22. Снытков, Е.В. Оценка вклада патогенетически значимых полиморфных вариантов генов семейств метилтрансфераз (*DNMT*) и метилдиоксигеназ (*TET*) в возрастание риска развития спорадических форм рака молочной железы / Е. В. Снытков, **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов // Молекулярная диагностика – 2017 : сборник трудов IX Всероссийской научно–практической конференции с международным участием, Москва, 18–20 апреля 2017 г. / ФБУН «Центральный научно–исследовательский институт эпидемиологии» ; под ред. В. И. Покровского. – Москва, 2017. – С. 139–140.

23. Смольник, Н. С. Частота распространенности полиморфного варианта p.P34S (rs1065852) гена *CYP2D6* среди пациентов со спорадическим раком молочной железы из Республики Беларусь / Н. С. Смольник, **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов // Молекулярная диагностика – 2017 : сборник трудов IX Всероссийской научно–практической конференции с международным участием, Москва, 18–20

апреля 2017 г. / ФБУН «Центральный научно–исследовательский институт эпидемиологии»; под ред. В. И. Покровского. – Москва, 2017. – С. 143–144.

24. **Кипень, В. Н.** Вклад полиморфного варианта р.Р34S (rs1065852) гена *CYP2D6* в генез спорадического рака молочной железы / **В. Н. Кипень**, Н. С. Смольник // Проблемы и перспективы развития современной медицины : сборник научных статей IX Республиканской научно–практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых, Гомель, 28 апреля 2017 г. / Гомельский государственный медицинский университет ; редкол.: А. Н. Лызикив [и др.]. – Гомель, 2017. – С. 324–326.

25. **Кипень, В. Н.** Полиморфный вариант р.L342V гена *CYP1B1* не увеличивает риск развития спорадического рака молочной железы для пациентов из Республики Беларусь / **В. Н. Кипень**, Н. С. Смольник // Проблемы и перспективы развития современной медицины : сборник научных статей IX Республиканской научно–практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых, Гомель, 28 апреля 2017 г. / Гомельский государственный медицинский университет ; редкол.: А. Н. Лызикив [и др.]. – Гомель, 2017. – С. 326–328.

26. Снытков, Е. В. Возможная роль полиморфных вариантов генов семейств метилтрансфераз и метилдиоксигеназ в модификации риска развития спорадических форм рака молочной железы / Е. В. Снытков, **В. Н. Кипень** // Проблемы и перспективы развития современной медицины : сборник научных статей IX Республиканской научно–практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых, Гомель, 28 апреля 2017 г. / Гомельский государственный медицинский университет ; редкол.: А. Н. Лызикив [и др.]. – Гомель, 2017. – С. 727–729.

Тезисы докладов

27. **Кипень, В. Н.** Исследование частоты распространенности полиморфизма rs167770 гена *DRD3* у пациентов с раком молочной железы в Республике Беларусь / **В. Н. Кипень** // Биология – Наука XXI века : 17–я Международная Пущинская школа–конференция молодых ученых, Пущино, 21–26 апреля 2013 г. : сборник тезисов. / Пущинский научный центр РАН. – Пущино, 2013. – С. 200–201.

28. **Кипень, В. Н.** Роль межгенных взаимодействий в формировании предрасположенности к РМЖ / **В. Н. Кипень** // Геномика и системная биология : VI Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике, Звенигород, 16–21 ноября 2014 г. : тезисы докладов. / Институт молекулярной генетики РАН. – Москва, 2014. – С. 26.

29. **Кипень, В. Н.** Связь полиморфизма с.6235T>C (MspI) гена *CYP1A1* с клинико–морфологическими характеристиками опухоли при спорадическом раке

молочной железы / **В. Н. Кипень**, Н. С. Смольник // XI Международная (XX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых, Москва, 17 марта 2016 г. : сборник тезисов. / РНИМУ им. Н. И. Пирогова ; под ред. М. А. Абакумова. – Москва, 2016. – С. 337.

30. **Кипень, В. Н.** Ассоциация полиморфизма g.43693C>T (rs167770) гена *DRD3* с возрастом верификации диагноза рак молочной железы / **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов // Современные биотехнологии для науки и практики : IV Международный симпозиум, посвященный дню ДНК – 2017, Санкт–Петербург, 27–28 апреля 2017 г. : сборник тезисов. / ФГБОУ ВО ПСПбГМУ имени И. П. Павлова ; редкол.: А. И. Карпищенко (гл. ред.) [и др.]. – Санкт–Петербург, 2017. – С. 46.

31. **Кипень, В. Н.** Выживаемость пациентов со sporadическим раком молочной железы в зависимости от патогенетического профиля по генам *XRCC3*, *GSTP1* и *MTHFR* / **В. Н. Кипень**, С. Б. Мельнов, С. Ю. Смирнов, А. Е. Океанов // Международный симпозиум по геномике, приуроченный к Году науки в Республике Беларусь, 21–23 ноября 2017 г. : тезисы докладов. / Институт цитологии и генетики НАН Беларуси [и др.]. – Минск, 2017. – С. 94–95.

РЭЗІЮМЭ

Кіпень Вячаслаў Мікалаевіч

Роля нізка- і сярэднепенетрантных генаў у развіцці спарадычнай формы рака малочнай залозы

Ключавыя словы: рак малочнай залозы, рэпарацыя, біятрансфармацыя, палімарфізм, стаўленне шанцаў, межгенныя ўзаемадзеяння, выжывальнасць.

Мэта даследавання: ацаніць магчымы ўклад у генез спарадычнага РМЗ паліморфных варыянтаў генаў, адказных за падтрыманне стабільнасці ДНК.

Метады даследавання: выдзяленне татальнай ДНК, аналіз палімарфізму даўжыні рэстрыкцыйных фрагментаў, алель-спецыфічная ПЛР, аналіз канфармацыйнага полімарфізму аднаніткавай ДНК, секвенаванне, статыстычны аналіз (стаўленне шанцаў, межгенныя ўзаемадзеяння, аналіз выжывальнасці).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Паліморфныя варыянты генаў сістэм рэпарацый – р.R559Q (ген *PALB2*), р.Q399R (ген *XRCC1*) і р.T241M (ген *XRCC3*), – паліморфны варыянт р.E429A гена *MTHFR* фалатнага цыклу, паліморфныя варыянты генаў сістэм біятрансформацыі ксенабіётікаў – р.I105V (ген *GSTP1*), g.43693C>T (ген *DRD3*), g.42524947C>T (ген *CYP2D6*), с.6235T>C (ген *CYP1A1*), – і таксама паліморфны варыянт g.10168778G>A гена *DNMT1* сістэмы метылявання ДНК асацыяваны з павышаным рызыкам развіцця спарадычных формаў РМЖ. Пэўныя спалучэння генатыпаў (генетычны профіль) неаллельных генаў сістэм рэпарацыі (ген *XRCC3*), фалатнага цыклу (ген *MTHFR*) і біятрансформацыі ксенабіётікаў (ген *GSTP1*) асацыяваныя з высокім рызыкам развіцця спарадычных формаў РМЖ. Генетычны профіль, які прыводзіць да значнага ўзрастання рызыкі развіцця дадзенага захворвання з'яўляецца: наяўнасць алеля G па палімарфізму р.I105V (ген *GSTP1*), алеля T па палімарфізму р.T241M (ген *XRCC3*) і генатыпу A/A па палімарфізму р.E429A (ген *MTHFR*). Доля пацыентаў з рызыка-асацыяраваным профілем па палімарфізмах р.T241M (ген *XRCC3*), р.I105V (ген *GSTP1*), р.E429A (ген *MTHFR*), якія памерлі ад асноўнага захворвання пасля ўстанаўлення дыягназу, пераўзыходзіць гэтую для пацыентаў без такога генетычнага профілю – $45,3 \pm 6,84\%$ і $21,4 \pm 7,75\%$ адпаведна, $p=0,019$.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: Вынікі даследавання рэкамендуецца выкарыстоўваць пры падрыхтоўцы студэнтаў вышэйшых навучальных устаноў, а таксама ва ўстановах аховы здароўя і профільных акадэмічных лабараторыях малекулярна-генетычнай накіраванасці.

Вобласць ужывання: генетыка, медыцына, навучальны працэс.

РЕЗЮМЕ**Кипень Вячеслав Николаевич****Роль низко- и среднепенетрантных генов в развитии спорадического рака молочной железы**

Ключевые слова: рак молочной железы, репарация, биотрансформация, полиморфизм, отношение шансов, межгенные взаимодействия, выживаемость.

Цель исследования: оценить возможный вклад в генез спорадического РМЖ полиморфных вариантов генов, ответственных за поддержание стабильности ДНК.

Методы исследования: выделение тотальной ДНК, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, аллель-специфическая ПЦР, анализ конформационного полиморфизма однонитевой ДНК, секвенирование, статистический анализ (отношение шансов, межгенные взаимодействия, анализ выживаемости).

Полученные результаты: Полиморфные варианты генов систем репарации – p.R559Q (ген *PALB2*), p.Q399R (ген *XRCC1*) и p.T241M (ген *XRCC3*), – полиморфный вариант p.E429A гена *MTHFR* фолатного цикла, полиморфные варианты генов систем биотрансформации ксенобиотиков – p.I105V (ген *GSTP1*), g.43693C>T (ген *DRD3*), g.42524947C>T (ген *CYP2D6*), c.6235T>C (ген *CYP1A1*), – а также полиморфный вариант g.10168778G>A гена *DNMT1* системы метилирования ДНК ассоциированы с повышенным риском развития спорадических форм РМЖ. Определенные сочетания генотипов (генетический профиль) неаллельных генов систем репарации (ген *XRCC3*), фолатного цикла (ген *MTHFR*) и биотрансформации ксенобиотиков (ген *GSTP1*) ассоциированы с высоким риском развития спорадических форм РМЖ. Генетическим профилем, который приводит к значительному возрастанию риска развития данного заболевания является: наличие аллеля G по ОНП p.I105V (ген *GSTP1*), аллеля T по ОНП p.T241M (ген *XRCC3*) и генотипа A/A по ОНП по p.E429A (ген *MTHFR*). Доля пациентов с риск-ассоциированным профилем по ОНП p.T241M (ген *XRCC3*), p.I105V (ген *GSTP1*), p.E429A (ген *MTHFR*), которые умерли от основного заболевания после установления диагноза, превосходит таковую для пациентов без данного профиля – $45,3 \pm 6,84\%$ и $21,4 \pm 7,75\%$ соответственно, $p=0,019$.

Рекомендации по использованию: Результаты исследования рекомендуется использовать при подготовке студентов высших учебных заведений, а также в учреждениях здравоохранения и академических лабораториях молекулярно-генетической направленности.

Область применения: генетика, медицина, образовательный процесс.

SUMMARY

Kipen Viachaslau N.

The role of low - and medium penetrant genes in the development of sporadic breast cancer

Key words: breast cancer, DNA repair, biotransformation, polymorphism, odds ratio, intergenic interactions, survival.

Aim of the study: to evaluate the possible contribution of polymorphic variants of genes responsible for maintaining DNA stability to the genesis of sporadic forms of breast cancer.

Methods: extraction of total DNA, length polymorphism restriction fragments, allele-specific PCR, conformational polymorphism of single-stranded DNA, sequencing, statistical analysis (odds ratio, intergenic interactions, survival analysis).

Results: SNPs of genes of repair systems – p.R559Q (*PALB2* gene), p.Q399R (*XRCC1* gene) and p.T241M (*XRCC3* gene), – SNP p.E429A of *MTHFR* gene of folate cycle, SNPs of genes of biotransformation systems of xenobiotics – p.I105V (*GSTP1* gene), g.43693C>T (*DRD3* gene), g.42524947C>T (*CYP2D6* gene), c.6235T>C (*CYP1A1* gene), and SNP g.10168778G>A of DNMT1 gene of system de-/remethylation DNA were associated with increased risk of developing of sporadic forms breast cancer. Specific combinations of genotypes (genetically profile) of nonallelic genes of repair systems (*XRCC3* gene), folate cycle (*MTHFR* gene) and xenobiotic metabolism (*GSTP1* gene) were associated with a high risk of developing sporadic forms of breast cancer. Genetic profile, which leads to a significant increase in the risk of this disease – allele G for SNP p.I105V (*GSTP1* gene), allele T for SNP p.T241M (*XRCC3* gene) and genotype AA for SNP p.E429A (*MTHFR* gene). The percentage of patients with risk-associated profile with SNPs p.T241M (*XRCC3* gene), p.I105V (*GSTP1* gene) and p.E429A (*MTHFR* gene), that died from underlying disease within 5 years after diagnosis, superior to that for patients without pathological genetic profile – 45,3±6,84% and 21,4±7,75%, respectively, p=0,019.

Recommendations for use: The results of this study is recommended to use in the training of students in higher education, and also in specialized scientific and practical health care institutions and specialized academic laboratories for molecular genetic area of activity.

Application area: genetics, medicine, educational process.

Подписано в печать 14.05.2018 Формат 60x841/16 Бумага офсетная
Гарнитура Roman Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4
Тираж 60 экз. Заказ № 2639

ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2
Тел. 8 029 684 18 66

E-mail: pravo-v@tut.by; pravo642@gmail.com Отпечатано на издательской системе
KONICA MINOLTA в ИООО «Право и экономика»

Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185