

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА WFDC2 У ПАЦИЕНТОК С ОБЪЕМНЫМИ ОБРАЗОВАНИЯМИ ЯИЧНИКОВ

Егунова М.А.¹, Брагина Е.Ю.², Куценко И.Г.¹

¹ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, e-mail: mariyaegunova@mail.ru;

²НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, e-mail: elena.bragina72@gmail.com

По данным литературы опухолевый маркер HE-4 обладает высокой специфичностью в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных объемных образований яичников и широко применяется в клинической практике гинекологов. Публикации, посвященные полиморфизму гена *WFDC2*, кодирующего опухолевый маркер HE-4, отсутствуют. Было проведено молекулярно-генетическое исследование с целью выявления связи полиморфных вариантов (rs2239533, rs2072956) гена *WFDC2* с наличием доброкачественных и злокачественных объемных образований яичников. В исследовании приняли участие 55 пациенток с объемными образованиями яичников и 40 здоровых женщин. У 38 (69,1%) пациенток основной группы при гистологическом исследовании были верифицированы доброкачественные образования яичников, у 17 (30,9%) – злокачественные. Опухолевый маркер HE-4 характеризовался высокой специфичностью (97,4%) при относительно низкой чувствительности (52,9%). В ходе молекулярно-генетического исследования было выявлено статистически значимое преобладание генотипа Т/Т полиморфного варианта rs2239533 гена *WFDC2* у пациенток с объемными образованиями яичников в сравнении с группой здоровых женщин. После разделения основной группы исследования на 2 подгруппы в зависимости от гистологических вариантов опухолей (доброкачественные или злокачественные) было установлено, что носительство генотипа Т/Т по варианту rs2239533 гена *WFDC2* было ассоциировано с наличием злокачественных форм.

Ключевые слова: объемное образование яичника, дифференциальная диагностика, опухолевый маркер, HE-4, полиморфизм, *WFDC2*, rs2239533, rs2072956.

POLYMORPHISM OF THE WFDC2 GENE IN PATIENTS WITH OVARIAN NEOPLASMS

Egunova M.A.¹, Bragina E.Y.², Kutsenko I.G.¹

¹Siberian State Medical University, Health Ministry of Russian Federation, Tomsk, e-mail: mariyaegunova@mail.ru;

²Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, e-mail: elena.bragina72@gmail.com

According to the literature data, the tumor marker HE-4 has high specificity in the differential diagnosis of benign and malignant ovarian neoplasms. The determination of the level of HE-4 is widely used in the clinical practice of gynecologists. Human epididymis protein 4 (HE-4) also called four-disulfide core domain protein 2 (*WFDC2*). There are no publications about polymorphism of the *WFDC2* gene. A molecular genetic study was carried out to identify the association of polymorphic variants (rs2239533, rs2072956) of the *WFDC2* gene with the presence of benign and malignant ovarian neoplasms. The study involved 55 patients with ovarian neoplasms and 40 healthy women. Benign ovarian neoplasms were detected in 38 (69,1%) patients of the main group, malignant ovarian neoplasms - in 17 (30,9%). Tumor marker HE-4 was characterized by high specificity (97,4%) with a low sensitivity (52,9%). A statistically significant prevalence of the T/T genotype of polymorphic variant rs2239533 of the *WFDC2* gene was revealed in patients with ovarian neoplasms in comparison with the group of healthy women. Then the main study group was divided into 2 subgroups depending on the histological variants of the tumors (benign or malignant). It was found that the carriage of the T/T genotype of variant rs2239533 of the *WFDC2* gene was associated with the presence of malignant ovarian tumors.

Keywords: ovarian neoplasm, differential diagnostics, tumor marker, HE-4, polymorphism, *WFDC2*, rs2239533, rs2072956.

В настоящее время с целью дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных объемных образований яичников (ДОЯ и ЗОЯ) на амбулаторном этапе в дополнение к стандартному определению уровня опухолевого маркера СА-125 в сыворотке

крови применяют анализ концентрации онкомаркера HE-4. Согласно ранее опубликованным данным возрастание концентрации СА-125 определялось у пациенток с ЗОЯ позже, чем статистически значимое повышение уровня HE-4 [1, 2], в связи с чем чувствительность HE-4 на ранних стадиях рака яичников (РЯ) значительно превышала таковой показатель для СА-125 (82,7% против 45,9% соответственно) [2]. Кроме того, в ряде исследований было показано, что уровень HE-4, превышающий границы референсных значений, выявлялся почти в 50% случаев РЯ с показателями СА-125, не превышающими дискриминационный уровень (ДУ) [1, 2].

HE-4 является продуктом гена *WFDC2* (WAP four-disulfide core domain protein 2) и относится к семейству кислых белков с предполагаемыми свойствами ингибитора трипсина [3]. Исследования, посвященные гену *WFDC2*, единичны и разнородны по своей сути. В 2014 г. было продемонстрировано, что избыточная экспрессия *WFDC2* в клетках эпителиальных ЗОЯ стимулирует опухолевый рост и прогрессирование заболевания [4]. В другом исследовании был замечен более высокий уровень экспрессии *WFDC2* в высокодифференцированных карциномах яичников в сравнении с низкодифференцированными [5]. Таким образом, была установлена связь между повышенным уровнем экспрессии *WFDC2* и более агрессивным клиническим течением заболевания [4, 5]. Ген *WFDC2* значительно экспрессируется у пациенток с серозным эпителиальным раком яичников, что было установлено посредством интеграции данных полногеномных экспрессионных микрочипов [6]. При сравнении экспрессии гена *WFDC2* в нормальной ткани яичника, неизмененных маточных трубах и образцах эпителиальных опухолей яичников, полученных во время первичных операций (до проведения химиотерапии), образцы эпителиальных ЗОЯ отличались значительно более высокой экспрессией по сравнению с нормальными яичниками ($p=0,000016$). Транскрипционная активность *WFDC2* в образцах эпителиального РЯ и в нормальных маточных трубах была сопоставимой ($p=1,00$). Помимо этого, не было выявлено корреляции между повышенным уровнем HE-4 и высокой экспрессией гена *WFDC2*, несмотря на то, что оба показателя независимо коррелируют с неблагоприятным прогнозом и низкими показателями выживаемости, что стало неожиданным открытием, требующим дальнейшего анализа и объяснения [7]. Данные исследований о влиянии полиморфизмов гена *WFDC2* на уровень опухолевого маркера в сыворотке крови, а также на развитие ДОЯ и ЗОЯ в отечественной и зарубежной литературе отсутствуют.

Цель исследования: выявить связь полиморфных вариантов (rs2239533, rs2072956) гена *WFDC2* с наличием доброкачественных и злокачественных объемных образований яичников.

Материалы и методы исследования. Молекулярно-генетическое исследование было выполнено 95 женщинам европеоидного происхождения (55 пациенткам с объемными образованиями яичников (ООЯ) и 40 женщинам контрольной группы). В исследовании приняли участие 55 пациенток гинекологической клиники ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер», поступившие для хирургического лечения по поводу объемных образований яичников, а также 40 женщин, по результатам гинекологического осмотра и УЗИ ОМТ которых не было выявлено патологических изменений.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (№ 4336 от 30.11.2015 г.), участниками исследования были подписаны информированные согласия.

Всем пациенткам проводились:

1) обследование согласно стандарту при объемных образованиях яичников (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России) от 01.11.2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю “акушерство и гинекология” (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)»);

2) определение уровня онкомаркера HE-4 методом хемилюминесцентного иммуноанализа (ARCHITECT, Abbott);

3) выделение ДНК из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции по стандартной методике [8], определение полиморфизмов rs2239533 и rs2072956 гена *WFDC2*;

4) анализ результатов гистологического исследования операционного материала у пациенток основной группы;

5) статистическая обработка полученных данных с помощью компьютерной программы SPSS Version20.

Дизайн и синтез праймеров для молекулярно-генетического исследования осуществлялись компанией «ДНК-синтез» (г. Москва). Амплификация проводилась в автоматическом термоциклере Real-time CFX Connect (Bio-Rad) по программе для проведения ПЦР в «реальном времени» согласно инструкции производителя праймеров. Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95°C в течение 3 минут с последующими 40 циклами отжига при температуре 95°C (20 секунд), элонгации цепи при 55°C (30 секунд) и денатурации при 72°C (40 секунд).

С целью статистической обработки материалов исследования были сформированы базы данных в формате таблиц SPSS. Проверка данных на подчинение нормальному закону распределения проводилась с использованием критерия Шапиро–Вилка. Для описания

количественных данных, имеющих нормальный закон распределения, использовалось среднее \pm стандартное (среднеквадратичное) отклонение ($M \pm \sigma$). Описание данных, не имеющих нормальный закон распределения, проводилось с помощью медианы и квартилей ($Me [Q25; Q75]$). Проверку соответствия наблюдаемых частот генотипов исследуемых полиморфизмов генов ожидаемым их частотам при соответствии равновесию Харди–Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса. Для сравнения частот аллелей и генотипов в группах исследования использовали χ^2 или точный тест Фишера (в случаях, когда наблюдений по крайней мере в одной из ячеек таблиц сопряженности было менее 5). Для выявления межгрупповых различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни. Об ассоциации разных генотипов с наличием ДОЯ или ЗОЯ судили по величине отношения шансов (Odds Ratio (OR)) с расчетом 95%-ного доверительного интервала. При $OR < 1$ судили об отрицательной связи между признаками, при $OR > 1$ – о положительной их связи. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Чувствительность (SE) опухолевого маркера рассчитывалась по формуле: $SE = TP / D^- \times 100\%$, где TP – истинно положительные результаты исследования, D^- – количество больных. Специфичность метода (SP) рассчитывалась по формуле: $SP = TN / D \times 100\%$, где TN – количество истинно отрицательных результатов исследования, D – количество здоровых пациентов.

Результаты исследования и их обсуждение. Основную группу исследования составили 55 пациенток с объемными образованиями яичников в возрасте от 19 до 79 ($48,5 \pm 2,2$) лет. В репродуктивном периоде находились 27 (49%) участниц исследования, в постменопаузальном – 28 (51%). В основной группе по результатам гистологического исследования операционного материала было диагностировано 38 (69,1%) ДОЯ и 17 (30,9%) ЗОЯ. Преимущественное распространение (74,6%) в основной группе исследования имели эпителиальные опухоли яичников, помимо этого, были верифицированы опухоли стромы полового тяжа (3,6%), герминогенные опухоли (9,1%), а также опухолеподобные поражения и опухолевидные процессы яичников (12,7%).

Уровень опухолевого маркера HE-4 у пациенток основной группы исследования варьировал от 12,6 до 1500 ($47,2 [36,0; 87,7]$) пмоль/л. У пациенток репродуктивного возраста в сыворотке крови были определены концентрации онкомаркера HE-4 от 12,6 до 922 ($40,4 [32,7; 68,0]$) пмоль/л (ДУ – 70 пмоль/л), у женщин с ООЯ в постменопаузе – от 37,3 до 1500 ($56,6 [43; 308,3]$) пмоль/л (ДУ – 140 пмоль/л). В основной группе исследования значения HE-4 превышали верхнюю границу референсного интервала у 10 пациенток, у 9 из которых при гистологическом исследовании послеоперационного материала был подтвержден РЯ, у 1 женщины – фолликулярная киста яичника в сочетании с кистой желтого

тела. Таким образом, чувствительность опухолевого маркера HE-4 в основной группе проведенного нами исследования составила 52,9% при специфичности 97,4%.

Ложноотрицательные результаты определения HE-4 были зарегистрированы у 8 (47,1%) пациенток с ЗОЯ, у которых были идентифицированы следующие типы опухолей: серозная карцинома в постменопаузе (n=4), муцинозная карцинома в репродуктивном возрасте (n=3), светлоклеточная карцинома в постменопаузе (n=1). В ранее опубликованных исследованиях уже было показано, что в сыворотке крови пациенток с эндометриоидными и светлоклеточными вариантами аденокарцином яичников, а также с муцинозным типом РЯ определяется низкая концентрация HE-4, что связано с источником происхождения вышеперечисленных опухолей [9–11].

В контрольную группу вошли 40 женщин в возрасте от 21 до 78 (50,5 [24,3; 60,0]) лет, из которых 20 (50%) – репродуктивного возраста, 20 (50%) – постменопаузального. Значения онкомаркера HE-4 в крови пациенток контрольной группы варьировали от 22,4 до 84,9 (40,2 [35,9; 52,3]) пмоль/л. Для пациенток репродуктивного периода были характерны уровни HE-4 от 22,4 до 50,2 (36 [31,6; 41,0]) пмоль/л, для женщин после наступления менопаузы – от 37,7 до 84,9 (51 [40,1; 57,8]) пмоль/л. Ложноположительных результатов определения HE-4 в контрольной группе исследования выявлено не было.

Для молекулярно-генетического анализа были выбраны полиморфные варианты гена *WFDC2* (rs2239533, rs2072956), которые были изучены в двух выборках, дифференцированных по наличию/отсутствию ООЯ.

Частоты генотипов по обоим исследуемым нами полиморфизмам в основной и контрольной группах соответствовали равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$).

При сравнительном анализе распространенности генотипов варианта rs2239533 гена *WFDC2* нами выявлено статистически достоверное ($\chi^2=4,671$, $p=0,031$) повышение частоты встречаемости гомозиготного генотипа Т/Т (78,2%) и снижение частоты гетерозиготного генотипа Т/С (20,0%) в основной группе по сравнению с контрольной группой (соответственно 57,5% и 42,5%) (рис. 1). По результатам расчета отношения шансов (OR) выявлено, что носительство генотипа Т/Т предрасполагало к наличию ООЯ (OR=2,649, (95% CI 1,081–6,487), $p=0,042$). Связи между генотипами и гистотипами ООЯ выявлено не было ($p > 0,05$).

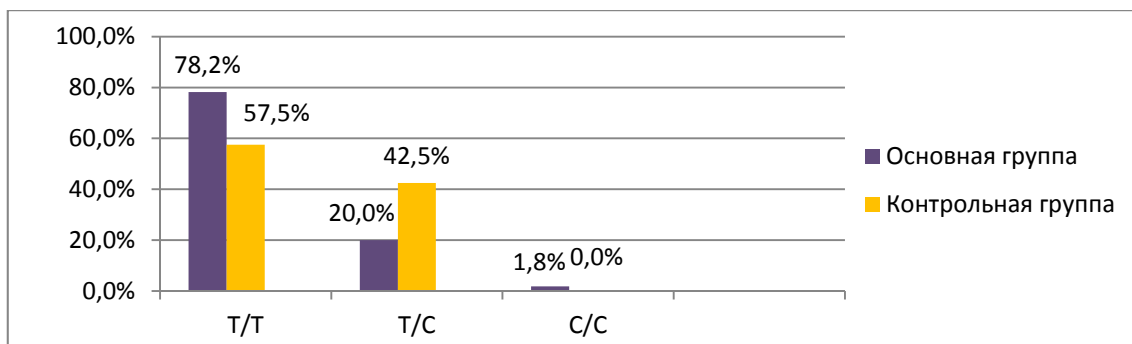


Рис. 1. Частота встречаемости генотипов полиморфизма rs2239533 гена WFDC2 у пациенток основной и контрольной групп

Распределение генотипов по варианту rs2072956 у пациенток основной группы было представлено в следующем порядке: максимальная частота регистрировалась для генотипа C/C-40 (72,7%), и по убыванию для генотипа C/G-14 (25,5%) и G/G-1 (1,8%). Среди пациенток контрольной группы генотип C/C встречался практически с той же частотой, что и в основной группе (72,5%, n=29), частота гетерозиготного генотипа C/G составила 27,5% (n=11) (рис. 2). Достоверных отличий при сравнении распределения частот генотипов по варианту rs2072956 гена WFDC2 между двумя группами выявлено не было ($\chi^2=0,001$, $p=0,981$), связи между генотипами и наличием ООЯ не обнаружено (OR=1,011 (95% CI 0,406–2,521), $p=0,466$).

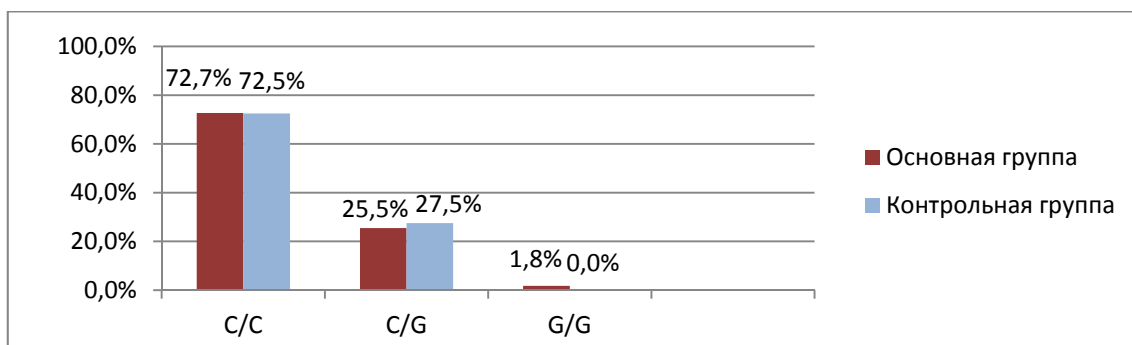


Рис. 2. Частота встречаемости генотипов полиморфизма rs2072956 гена WFDC2 у пациенток основной и контрольной групп

На втором этапе оценки влияния молекулярно-генетических факторов на развитие ООЯ основная группа была разделена на 2 подгруппы (1-я подгруппа – женщины с ДОЯ, 2-я подгруппа – пациентки с ЗОЯ).

Распределение генотипов для изученных полиморфных вариантов гена WFDC2 (rs2239533 и rs2072956) у пациенток с ДОЯ и ЗОЯ представлено на рисунках 3 и 4 соответственно.

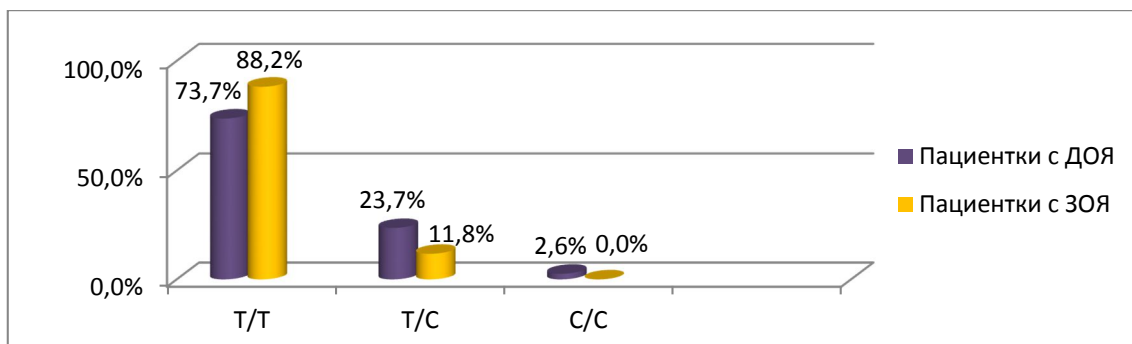


Рис. 3. Частота встречаемости генотипов полиморфизма rs2239533 гена *WFDC2* у пациенток с ДОЯ и ЗОЯ

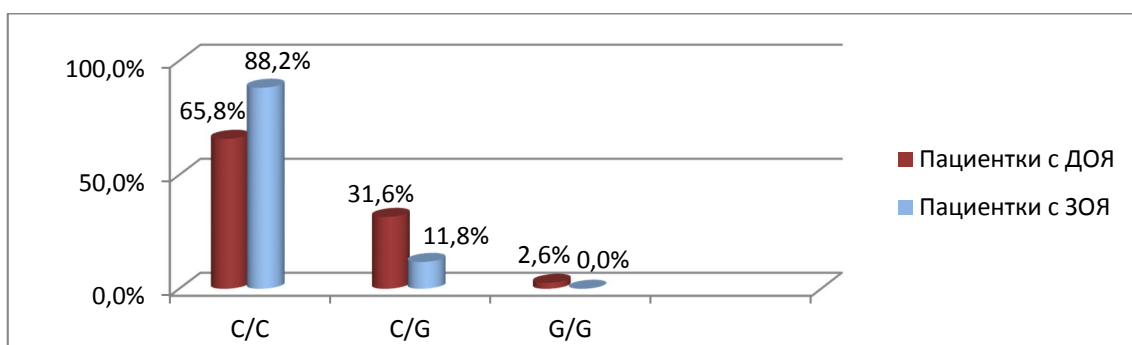


Рис. 4. Частота встречаемости генотипов полиморфизма rs2072956 гена *WFDC2* у пациенток с ДОЯ и ЗОЯ

Статистически значимых различий при сравнении распределения генотипов у пациенток с ДОЯ и ЗОЯ не обнаружено (для rs2239533 $\chi^2=1,458$, $p=0,228$; для rs 2072956 $\chi^2=2,983$, $p=0,085$).

При сравнении частот генотипов варианта rs2239533 гена *WFDC2* между подгруппами пациенток с ДОЯ/ЗОЯ и группой здоровых женщин выявлено повышение частоты генотипа T/T (88,2%) и снижение частоты генотипа T/C (11,8%) у женщин с ЗОЯ в сравнении с пациентками контрольной группы (57,5% и 42,5% соответственно; $\chi^2=5,071$, $p=0,025$). Генотип T/T полиморфного варианта rs2239533 гена *WFDC2* являлся рисковым для развития ЗОЯ (OR=5,54 (95% CI 1,12–27,54), $p=0,03$).

Корреляций между уровнями онкомаркера HE-4 в сыворотке крови и генотипами по изученным полиморфизмам выявлено не было ($p=0,153$ для rs2239533, $p=0,549$ для rs2072956). Но было отмечено, что все пациентки, в сыворотке крови которых была выявлена концентрация опухолевого маркера HE-4, превышающая установленный ДУ, имели генотип T/T по полиморфизму rs2239533 и C/C по полиморфизму rs2072956.

Объем выборки проведенного нами исследования очень мал, однако полученные данные могут послужить толчком к дальнейшим более масштабным исследованиям,

посвященным полиморфизмам гена *WFDC2*.

Заключение. В ходе молекулярно-генетического исследования было выявлено, что у пациенток с ООЯ в сравнении с группой здоровых женщин значимо преобладал генотип Т/Т полиморфного варианта rs2239533 гена *WFDC2* ($\chi^2=4,671$, $p=0,031$). Последующий анализ, проведенный с разделением больных на подгруппы в соответствии с гистологическими вариантами ООЯ (доброкачественные/злокачественные), позволил выявить, что носительство генотипа Т/Т по варианту rs2239533 гена *WFDC2* было ассоциировано с наличием злокачественных форм (OR=5,54 (95% CI 1,12–27,54), $p=0,03$). Полученные результаты требуют уточнения и дальнейшего изучения с увеличением объема выборки.

Список литературы

1. Bast R.C., Skates S., Lokshin A., Moore R.G., Differential diagnosis of pelvic mass: improved algorithms and novel biomarkers. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2012. Vol. 22. P. 5-8.
2. Havrilesky L.J., Whitehead C.M., Rubatt J.M., Cheek R.L., Groelke J., He Q., Malinowski D.P., Fischer T.J., Berchuck A. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecologic Oncology*. 2008. Vol. 110, N 3. P. 374-382.
3. Hellström I., Raycraft J., Hayden-Ledbetter M., Ledbetter J.A., Schummer M., McIntosh M., Drescher C., Urban N., Hellström K.E. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research*. 2003. Vol. 63, N 13. P. 3695-3700.
4. Moore R.G., Hill E.K., Horan T., Yano N., KyuKwang Kim, MacLaughlan S., Lambert-Messerlian G., YiTang Don Tseng, Padbury J.F., Miller M.C., Lange T.S. and Singhb R.K. HE4 (WFDC2) gene overexpression promotes ovarian tumor growth [Electronic resource]. *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880958>.
5. Zhu Y.F., He L.S., Zhang Z.D., Huang Q.S. Expression of serum human epididymal secretory protein HE4 at low grade and high grade serous carcinomas. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2012. Vol. 5, N 12. P. 925-930.
6. Yang X., Zhu S., Li L., Zhang L., Xian S., Wang Y., Cheng Y. Identification of differentially expressed genes and signaling pathways in ovarian cancer by integrated bioinformatics analysis. *OncoTargets Ther.* 2018. N 12. P. 1457-1474.
7. Gąsiorowska E., Walkowiak G.P., Warchoń W., Lemańska A., Jankowska A., Nowak-Markwitz E. Ovarian cancer and normal fallopian tube high WFDC2 expression does not correlate with HE4 serum level. *Ginekol. Pol.* 2015. Vol. 86, N 5. P. 335–339.

8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / пер. с англ. языка под ред. А.А. Баева и К.Г. Скрябина // М.: Мир, 1984. 479 с.
9. Georgakopoulos P., Mehmood S., Akalin A., Shroyer K.R. Immunohistochemical localization of HE4 in benign, borderline, and malignant lesions of the ovary. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2012. Vol. 31. P. 517-523.
10. Сергеева Н.С., Алентов И.И., Маршутина Н.В. Белок эпидидимиса человека не4 как новый опухолеассоциированный маркер. *Онкогинекология.* 2016. № 4. С. 48-58.
11. Molina R., Escudero J.M., Augé J.M., Filella X., Foj L., Torné A., Lejarcegui J., Pahisa J. HE4 a novel tumors marker for ovarian cancer: comparison with CA125and ROMA algorithm in patients with gynecological diseases. *Tumor. Biol.* 2011. Vol. 32, N 6. P. 1087-1095.