

УДК 618.19-006.6-036.8:575.174.015

DOI: 10.34215/1609-1175-2022-2-50-53

Риск развития рецидива рака молочной железы при наличии делеционного полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1*

И.С. Гулян^{1,3}, Г.С. Гулян³, Е.В. Елисеева¹, В.И. Апанасевич¹, О.В. Шевченко^{1,3}, М.П. Исаева²¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия;² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия³ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Цель: установить связь между эффективностью химиотерапии (ХТ) при раке молочной железы (РМЖ), риском развития рецидива заболевания и полиморфизмом генов глутатион-S-трансфераз (*GSTT1*, *GSTM1*). **Материал и методы.** Обследовано 132 пациентки с диагнозом РМЖ, в возрасте от 23 до 79 лет (средний возраст – 48 ± 13 лет), получивших химиотерапевтическое лечение (неoadъювантная (НАХТ), адъювантная (АХТ)). Детекцию делеционных (нулевых) генотипов *GSTM1* и *GSTT1* осуществляли с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции с последующим анализом кривых плавления продуктов реакции. **Результаты.** Выявлена статистически значимая связь между наличием нулевого генотипа *GSTM1-0* и сниженным риском развития рецидива РМЖ у пациентов в III стадии РМЖ (RR= 0,721; 95% ДИ: 0,524–0,992, p=0,034). В тоже время для *GSTT1* наличие нулевого генотипа не оказывало статистически значимого влияния на риск развития рецидива (RR= 0,543; 95% ДИ: 0,274– 1,077, p=0,015) при сохранении тенденции преобладания *GSTT1 0/0* среди пациентов без рецидива РМЖ. **Заключение.** Отсутствие активности ферментов *GSTT1* или *GSTM1* у носителей нулевых генотипов ведет к снижению детоксикационной способности и, соответственно, к более длительной циркуляции активных метаболитов цитостатиков и активных форм кислорода, что может пролонгировать воздействие активных метаболитов химиопрепаратов на опухолевые клетки. Наличие функционально активных ферментов глутатион-S-трансфераз способствует быстрой элиминации лекарственных препаратов и увеличивает риск развития рецидива РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, генетический полиморфизм, гены *GSTT1*, *GSTM1*

Поступила в редакцию 26.01.2022. Получена после доработки 15.02.2022. Принята к печати 04.03.2022

Для цитирования: Гулян И.С., Гулян Г.С., Елисеева Е.В., Апанасевич В.И., Шевченко О.В., Исаева М.П. Риск развития рецидива рака молочной железы при наличии делеционного полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1*/ Тихоокеанский медицинский журнал. 2022; 2:50–53. doi: 10.34215/1609-1175-2022-2-50-53

Для корреспонденции: Изабелла Самсоновна Гулян – ассистент института хирургии Тихоокеанского государственного медицинского университета (690002, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2); врач-онколог МЦ ДВФУ (690920, г. Владивосток, о. Русский, пос. Аякс, 10); ORCID: 0000-0001-7072-1688; РИНЦ-3946-2290, e-mail: isabella.g@mail.ru

The risk of recurrence of breast cancer in the presence of deletion polymorphism of the *GSTT1* and *GSTM1* genes

I.S. Gulyan^{1,3}, G.S. Gulyan^{1,3}, E.V.Eliseeva¹, V.I.Apanasevich¹, O.V. Shevchenko^{1,3}, M.P. Isaeva²¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia;² G.B.Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russia;³ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Objective: The aim of the study was to establish the relationship between the effectiveness of chemotherapy (CMT) in case of breast cancer and the risk of recurrence with polymorphism of glutathione-S-transferase (*GSTT1*, *GSTM1*) genes. **Methods:** The study involved 132 women having breast cancer diagnosed, aged 23 to 79 years (average age 48 ± 13 years). They received chemotherapy treatment (neoadjuvant (NACMT), adjuvant (ACMT)). The detection of deletion (null) genotypes *GSTM1* and *GSTT1* was carried out using multiplex PCR followed by analysis of the melting curves of the reaction products. **Results:** Statistically significant connection between the presence of a null genotype *GSTM1-0* and a reduced risk of breast cancer recurrence in patients having stage III BC (RR = 0.721; 95% CI: 0.524-0.992, p = 0.034). At the same time, the presence of *GSTT1-0* genotype didn't have statistically significant effect on the risk of recurrence (RR = 0.543; 95% CI: 0.274– 1.077, p = 0.015). However, the tendency of the prevalence of *GSTT1 0/0* among patients without recurrence of breast cancer persisted. **Conclusions:** The lack of activity of the *GSTT1* or *GSTM1* enzymes in carriers of null genotypes can lead to a decrease in detoxification capacity and, accordingly, to a longer circulation of active metabolites of medicine and reactive oxygen species. It prolongs the time of exposure of chemotherapy drugs on tumor cells. The functionally active enzymes may increase the risk of breast cancer recurrence due to rapid elimination of drugs.

Keywords: breast cancer, genetic polymorphism, *GSTT1*, *GSTM1* genes

Received 26 January 2022; Revised 15 February 2022; Accepted 04 March 2022

For citation: Gulyan I.S., Gulyan G.S., Eliseeva E.V., Apanasevich V.I., Shevchenko O.V., Isaeva M.P. The risk of recurrence of breast cancer in the presence of deletion polymorphism of the *GSTT1* and *GSTM1* genes.. *Pacific Medical Journal*. 2022;2:50–53. doi: 10.34215/1609-1175-2022-2-50-53

Corresponding author: Isabella S. Gulyan, Assistant at the Institute of Surgery of the Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave., Vladivostok, 690002, Russian Federation); oncologist at the FEPU MC (10 Ajax Bay, Russky Island, Vladivostok, 690922, Russian Federation); ORCID: 0000-0001-7072-1688; RSCI-3946-2290, e-mail: isabella.g@mail.ru

В структуре онкологической патологии рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место (11,7%) по заболеваемости в мире, опережая рак легкого (11,4%), и 5 место (6,9%) по причине смертности от злокачественных новообразований [1]. Несмотря на значительные успехи в диагностике РМЖ, пациенты чаще обращаются к врачу на стадиях, требующих назначения химиотерапии (ХТ). Применение современных схем ХТ не гарантирует выздоровления, у части пациентов может быть достигнута длительная ремиссия, у других возникает рецидив на фоне лечения. Эффективная терапевтическая стратегия основывается на молекулярно-биологических маркерах опухоли и генетических особенностях пациента [2].

Значительное влияние на эффективность ХТ оказывает функциональное состояние ферментов системы биотрансформации ксенобиотиков, модулируя цитотоксическое влияние лекарственного препарата. Механизмы биотрансформации ксенобиотиков, включают систему глутатион-S-трансферазы (*GSTT1*, *GSTM1*), которая превращает потенциальные канцерогены и лекарственные вещества в полярные водорастворимые метаболиты, способствуя их выведению из организма [3]. Изучение полиморфизмов генов *GSTT1* и *GSTM1* значительно расширяет возможности персонализированного подхода в подборе цитостатиков.

Цель настоящего исследования – установить связь между эффективностью ХТ, риском развития рецидива РМЖ и полиморфизмом генов *GSTT1* и *GSTM1*.

Материал и методы

В исследовании участвовали 132 пациентки с диагнозом РМЖ, в возрасте 23-79 лет, получивших химиотерапевтическое лечение (неoadъювантная (НАХТ), адъювантная (АХТ)) в ГБУЗ Приморском краевом онкологическом диспансере г. Владивостока в 2013-2020 гг.

Исследование выполнено в соответствии приказом МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики», Федеральным законом «Об обращении лекарственных средств» (от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации: «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта, в том числе исследований биологических материалов» (2013 г.), стандартами CONSORT и GCP. У всех пациенток, участвующих в исследовании, было получено письменное информированное согласие. Протокол исследования утвержден на заседании этического комитета ФГБОУ ВО ТГМУ (протокол № 3 от 16.11.2020 г.).

В исследование включены пациентки с I-III стадиями, в соответствии с клинко-морфологической (TNM) классификацией опухолей. В качестве цитостатических препаратов были использованы: доксорубин, циклофосфан, 5-фторурацил, препараты таксанового ряда, карбоплатин, в составе стандартных схем, применяемых для лечения РМЖ. Пациентки

были разделены на 2 группы: с рецидивом заболевания и без рецидива, время наблюдения варьировалось от 5 до 7 лет.

Для генотипирования использовали образцы геномной ДНК, выделенные из венозной крови онкологических пациентов с помощью колоночного набора High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Швейцария) согласно инструкции производителя. Детекцию нулевых генотипов *GSTM1* и *GSTT1* осуществляли с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции с последующим анализом кривых плавления продуктов реакции [4]. Рецидив заболевания оценивался общеклиническими, лабораторными и инструментальными методами обследования пациентов с РМЖ согласно стандартам оказания медицинской помощи. Для определения статистических параметров использовались программы MS Excel и Statistica 10.0. Сравнение качественных признаков проводилось с помощью таблиц сопряженности 2×2 по критерию χ^2 Пирсона с поправкой Йетса и точному критерию Фишера. Относительный риск развития рецидива по конкретному признаку вычисляли с определением 95% доверительного интервала. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

При исследовании делеционного полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1* мы рассматривали два варианта их фенотипического проявления. Нефункциональный вариант обеспечивается гомозиготным состоянием по нулевому аллелю *GSTT1-0* или *GSTM1-0* («нулевой» генотип, 0/0). Второй, функциональный, вариант представлен гетерозиготным, либо гомозиготным состоянием по функциональному аллелю *GSTT1-1* или *GSTM1-1* («норма», 0/+ или +/-).

Частота нулевых генотипов *GSTT1*, *GSTM1* при РМЖ без рецидива была выше, чем у пациентов с рецидивом (24,2 % против 10 % и 56,5% против 41,4 %, соответственно), указывая на обратную связь между носительством нормальных генотипов и риском развития рецидива РМЖ после ХТ ($\chi^2 = 4,769$, при $p = 0,029$ и $\chi^2 = 2,971$ при $p = 0,085$). Риск развития рецидива РМЖ у пациентов, прошедших ХТ, ниже при гомозиготном сочетании *GSTT1-0* в 1,8 раз ($RR = 0,556$; 95% ДИ: 0,295 – 1,046, $p = 0,029$), а по *GSTM1-0* в 1,3 раза ($RR = 0,752$; 95% ДИ: 0,540–1,047, $p = 0,085$), чем у пациентов гомозиготных или гетерозиготных по нормальному аллелю *GSTT1-1*, *GSTM1-1*. Однако эти показатели были статистически не значимыми при выбранном 95% доверительном интервале (рис. 1).

Выявленная тенденция снижения риска развития рецидива после ХТ при наличии нулевых генотипов *GSTT1* и *GSTM1*, позволили провести подгрупповой анализ данных в отношении стадии заболевания. Эффективность ХТ является особенно актуальной при лечении больных в III стадии РМЖ. Так, при анализе пациентов в зависимости от стадии заболевания

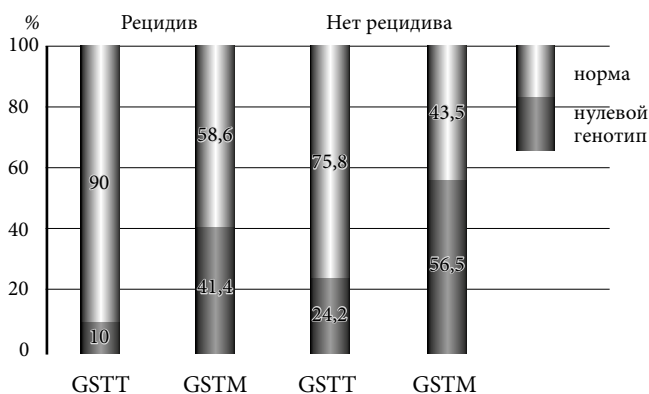


Рис. 1. Распределение генотипов GSTT1 и GSTM1 у пациентов с диагнозом РМЖ I-III стадий.

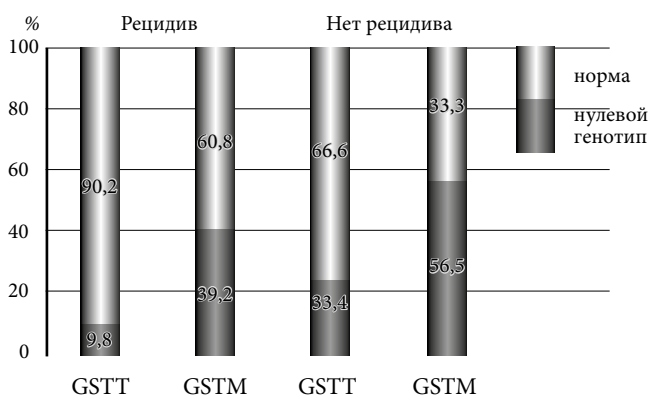


Рис. 2. Распределение частот генотипов GSTT1 и GSTM1 у пациентов с диагнозом РМЖ III стадии с рецидивом и без рецидива.

статистически значимая связь между носительством нулевого генотипа *GSTM1* и сниженным риском развития рецидива РМЖ была обнаружена у пациентов в III стадии (RR= 0,721; 95% ДИ: 0,524–0,992, $p=0,034$) (рис. 2). В тоже время для *GSTT1* наличие нулевого генотипа не оказывало статистически значимого влияния на риск развития рецидива (RR= 0,543; 95% ДИ: 0,274–1,077, $p=0,015$) при сохранении тенденции преобладания *GSTT1* 0/0 среди пациентов без рецидива РМЖ.

Обсуждение полученных данных

Большинство химиотерапевтических препаратов в организме человека подвергается биотрансформации и обретают свойства активных цитотоксических метаболитов.

Доксорубицин и паклитаксел, вызывают образование активных форм кислорода (АФК), разрушающие биологические макромолекулы. Однако часть опухолей вырабатывают цитопротективный механизм, препятствующий развитию окислительного стресса. В результате опухолевые клетки сохраняют жизнеспособность, развивают химиорезистентность, что ведет к рецидиву и прогрессированию заболевания [5].

Глутатион-S-трансферазы катализируют реакции конъюгации глутатиона с большим числом неполярных эндогенных и экзогенных метаболитов [2]. Они также инактивируют 4-гидроксициклофосфамид

(циклофосфамид) посредством конъюгации с тиолом или сульфатом [3].

Делеции участков генов *GSTT1* и *GSTM1* приводят к снижению активности ферментов биотрансформации, в результате чего в организме длительное время циркулируют промежуточные продукты детоксикации I фазы и АФК, оказывающие токсическое воздействие на клетки. Следовательно, индивиды с данными полиморфными вариантами могут быть более восприимчивы цитотоксическому влиянию препаратов.

Данные о связи полиморфных вариантов генов глутатион-S-трансфераз и риска развития рецидива РМЖ имеют противоречивый характер. Так, С.В. Ambrosone и соавт. [3] изучали полиморфизм генов *GSTT1* и *GSTM1* у пациенток с РМЖ, получавших химио- и лучевую терапию. Авторы пришли к выводу, что у носительниц нулевых генотипов снижен риск смерти и развития рецидива, вследствие редукции активности антиоксидантной системы и длительного повреждающего воздействия АФК.

Анализируя эффективность платиносодержащих режимов ХТ и препаратов таксанового ряда при раке яичников D. Pereira и соавт. [6] отмечают, что генотип *GSTM1* 0/0 улучшает 5-летнюю выживаемость, в то время как при полиморфизме *GSTT1* статистически значимых различий не обнаруживается.

В недавно опубликованном систематическом обзоре, сообщается, что пациентки с нулевым генотипом *GSTM1* лучше отвечают на лечение РМЖ, однако подчеркивается необходимость дальнейшего анализа в этой области из-за неубедительных результатов многих исследований [7].

Протективное влияние нулевого генотипа *GSTM1* при РМЖ неизменно связано с лучшим ответом на ХТ и увеличением общей выживаемости пациенток [8,9,10].

Однако ряд исследований не выявили взаимосвязи между делеционными полиморфизмами генов глутатион-S-трансфераз и прогнозом РМЖ. А.И. Oliveira и соавт. [11], оценивая эффект НАХТ у пациенток с РМЖ, не нашли статистически значимой связи между полиморфными вариантами генов *GSTT1* и *GSTM1*. Не было выявлено корреляции между полиморфизмами генов *GST* и риском развития рецидива РМЖ в азиатской популяции [12].

Существует ряд исследований, где описывается отрицательное влияние нулевых генотипов глутатион-S-трансфераз на прогноз и ответ на ХТ. При этом отмечается слабый ответ на ХТ и снижение общей выживаемости у пациентов с РМЖ и нулевым генотипом *GSTM1*. В то же время, связи между *GSTT1* и ответом на ХТ не обнаружено [13].

В работе, посвященной лечению острого миелоидного лейкоза у пациентов с делециями глутатион-S-трансфераз, отмечался слабый ответ на ХТ и самая короткая выживаемость, что, по-видимому, связано с более длительным воздействием токсичных метаболитов [14]. Достаточно крупное исследование 714

пациенток с РМЖ, показало, что нормальный генотип *GSTM1* соотносится с лучшей безрецидивной выживаемостью в группе без ХТ, однако эффект нивелировался в группе с АХТ [15].

Заключение

Отсутствие активности ферментов *GSTT1* или *GSTM1* у носителей нулевых генотипов ведет к снижению детоксикационной способности и, соответственно, к более длительной циркуляции активных метаболитов цитостатиков и АФК, что, в свою очередь, пролонгирует воздействие метаболитов химиопрепаратов на опухолевые клетки. Наличие функционально активных ферментов может увеличивать риск развития рецидива РМЖ в связи с более быстрой элиминацией лекарственного препарата. Понимание роли *GSTT1* или *GSTM1* при проведении химиотерапии при РМЖ является важнейшим звеном персонализированной терапии.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – МПИ

Сбор и обработка материала – ИСГ

Статистическая обработка – ОБШ

Консультативная помощь – ЕВЕ

Обзор публикаций по теме статьи – ГСГ

Написание текста – ИСГ

Редактирование – ЕВЕ, ВИА, МПИ

Литература/Reference

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209- 49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
2. Pires BRB, Panis C, Alves VD, Herrera ACSA, Binato R, Pizzatti L, Cecchini R, Abdelhay E. Label-free proteomics revealed oxidative stress and inflammation as factors that enhance chemoresistance in luminal breast cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;5357649. <https://doi.org/10.1155/2019/5357649>.
3. Ambrosone CB, Sweeney C, Coles BF, Thompson PA, McClure GY, Korourian S, Fares MY, Stone A, Kadlubar FF, Hutchins LF. Polymorphisms in glutathione S-transferases (*GSTM1* and *GSTT1*) and survival after treatment for breast cancer. *Cancer Res.* 2001;61:7130-5.
4. Гулян И.С., Быстрицкая Е.П., Чернышева Н.Ю., Елисеева Е.В., Апанасевич В.И., Исаева М.П. Делеционный полиморфизм генов глутатион-S-трансфераз (*GSTT1*, *GSTM1*) у пациенток с раком молочной железы в Приморском крае. *Опухоли женской репродуктивной системы.* 2020;16:25-31. [Gulyan I.S., Bystritskaya E.P., Chernysheva N.Yu., Eliseeva E.V., Apanasovich V.I., Isaeva M.P. Deletion polymorphism of glutathione S-transferases genes (*GSTT1*, *GSTM1*) in patients with breast cancer in Primorye region. *Tumors of female reproductive system.* 2020;16:25-31. (In Russ.)].
5. Hausman-Cohen SR, Hausman-Cohen LJ, Williams GE, Bilich CE. Genomics of detoxification: how genomics can be used for targeting potential intervention and prevention strategies including nutrition for environmentally acquired illness. *J Am Coll Nutr.* 2020;39:94-102. <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1713654>.
6. Pereira D, Assis J, Gomes M, Nogueira A, Medeiros R. Improvement of a predictive model in ovarian cancer patients submitted to platinum-based chemotherapy: implications of a GST activity profile. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016;72:545-53. <https://doi.org/10.1007/s00228-016-2015-3>.
7. Pacholak LM, Amarante MK, Guembarovski RL, Watanabe MAE, Panis C. Polymorphisms in *GSTT1* and *GSTM1* genes as possible risk factors for susceptibility to breast cancer development and their influence in chemotherapy response: a systematic review. *Mol Biol Rep.* 2020;47:5495-5501. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05555-8>.
8. Soto-Quintana O, Zúñiga-González GM, Ramírez-Patiño R, Ramos-Silva A, Figuera LE, Carrillo-Moreno DI, Gutiérrez-Hurtado IA, Puebla-Pérez AM, Sánchez-Llamas B, Gallegos-Arreola MP. Association of the *GSTM1* null polymorphism with breast cancer in a Mexican population. *Genet Mol Res.* 2015;14:13066-75. <https://doi.org/10.4238/2015.October.26.2>.
9. Wang J, Wang T, Yin GY, Yang L, Wang ZG, Bu XB. Glutathione S-transferase polymorphisms influence chemotherapy response and treatment outcome in breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14:11126-32. <https://doi.org/10.4238/2015.September.22.6>.
10. Kong X, Li Z, Li X. *GSTP1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms as predictors of response to chemotherapy in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78:1163-1173. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3173-9>.
11. Oliveira AL, Oliveira Rodrigues FF, Dos Santos RE, Rozenowicz RL, Barbosa de Melo M. *GSTT1*, *GSTM1*, and *GSTP1* polymorphisms as a prognostic factor in women with breast cancer. *Genet Mol Res.* 2014;13:2521-30. <https://doi.org/10.4238/2014.January.22.9>.
12. Yang G, Shu XO, Ruan ZX, Cai QY, Jin F, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer.* 2005;103:52-8. <https://doi.org/10.1002/cncr.20729>.
13. Wang X, Huang ZH. Predictive potential role of glutathione S-transferase polymorphisms in the prognosis of breast cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14:10236-41. <https://doi.org/10.4238/2015.August.28.7>.
14. Voso M., D'Alo' F., Putzulu R., Mele L, Scardocci A, Chiusolo P, Latagliata R, Lo-Coco F, Rutella S, Pagano L, Hohaus S, Leone G. Negative prognostic value of glutathione S-transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) deletions in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;100:2703-7. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.8.2703>.
15. Li S, Lang GT, Zhang YZ, Yu KD, Shao ZM, Zhang Q. Interaction between glutathione S-transferase M1-null/present polymorphism and adjuvant chemotherapy influences the survival of breast cancer. *Cancer Med.* 2018;7:4202-4207. <https://doi.org/10.1002/cam4.1567>.