

# Оценка риска возникновения рака молочной железы и рака желудка путем определения вариантов полиморфизма 5mC/T в интроне гена KIF26B в положении xp1: 24561812

**А.Г. Акишев<sup>1\*</sup>, Н.А. Нетесова<sup>2</sup>, М.А. Абдурашитов<sup>1</sup>, И.В. Вихлянов<sup>3</sup>, М.К. Никитин<sup>3</sup>, А.Б. Карпов<sup>4</sup>, [С.Х. Дегтярев<sup>1</sup>](#)**

<sup>1</sup> НПО «СибЭнзим» Новосибирск

<sup>2</sup> ООО «Эпигенлаб» Новосибирск

<sup>3</sup> КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», г. Барнаул

<sup>4</sup> ФГУП Северский биофизический научный центр ФМБА России, г. Северск, Томская область

\* автор для переписки: Александр Акишев, НПО СибЭнзим, ул. Тимакова, д. 2/12, Новосибирск, 630117, Россия; тел.: +7(383)333-4991; факс: +7(383)333-6853; E-mail: [aki@sibenzyme.ru](mailto:aki@sibenzyme.ru)

Методами Glal- и FatI-ПЦР анализа определяли частоты вариантов полиморфизма 5mC/T в положении xp1: 245618129 (по геномной сборке GRCh38.p13) в препаратах ДНК, выделенной из клеток крови 51 больного раком молочной железы (РМЖ) и 63 больных раком желудка (РЖ). Полученные данные были сравнены с аналогичными показателями для 92 здоровых доноров крови, установленными ранее.

Показано, что цитозинное основание в данной позиции находится преимущественно в метилированной форме во всех образцах ДНК. Встречаемость диплоидного набора C/C в указанной позиции у больных РМЖ и РЖ составляет 9.8% и 7.94%, соответственно. Это существенно отличается от встречаемости гомозигот по C у здоровых женщин (26.09%) и здоровых доноров обоих полов (22.83%). При этом встречаемость гетерозигот C/T и гомозигот T/T у больных РЖ и РМЖ превышает аналогичные показатели для контрольных групп здоровых людей на 5.5-10.7%. Таким образом, наличие у людей генотипа T/T в положении xp1: 245618129 является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о предрасположенности к РМЖ и РЖ, и в 2.7-2.9 раз увеличивающим риск возникновения заболевания по сравнению с носителями генотипа C/C.

**Ключевые слова:** однонуклеотидный полиморфизм 5mC/T, ДНК из крови человека, Glal-ПЦР анализ, FatI-ПЦР анализ, рак молочной железы, рак желудка

**DOI:** [10.26213/SE.2019.78.40307](https://doi.org/10.26213/SE.2019.78.40307)

## **Данные для цитирования:**

Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Вихлянов И.В., Никитин М.К., Карпов А.Б., Дегтярев С.Х. (2021) Оценка риска возникновения рака молочной железы и рака желудка путем определения вариантов полиморфизма 5mC/T в интроне гена KIF26B в положении xp1: 24561812, Эпигенетич ДНК диагност, том 2021(1), DOI: [10.26213/SE.2019.78.40307](https://doi.org/10.26213/SE.2019.78.40307)

Эта статья доступна по лицензии [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

## Введение

Ранее нами было проведено определение частоты аллелей С и Т в позиции chr1: 245618129 для группы условно здоровых жителей сибирского региона (46 женщин и 46 мужчин) методом Glal- и FatI-ПЦР\_анализа [1].

В базе данных dbSNP этой однонуклеотидной вариации, расположенной в интроне гена KIF26B, присвоен номер rs7516354 [2]. В ряде публикаций KIF26B описан как онкоген, экспрессия которого увеличивается при таких онкопатологиях, как рак молочной железы [3], рак желудка [4] и колоректальный рак [5]. В настоящей работе методом Glal- и FatI-ПЦР\_анализа определялась встречаемость аллелей и частоты гомо- и гетерозигот для полиморфизма rs7516354 в группах больных раком молочной железы и раком желудка. Результаты анализа сравнивались с ранее полученными данными для здоровых доноров.

## Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК из лейкоцитов периферической крови 51 больного раком молочной железы (РМЖ) и 63 больных раком желудка (РЖ). Выделение ДНК и способ определения вариантов диплоидного набора для полиморфизма С/Т детально описаны в работах [1,6]. Для анализа был использован Набор для детекции полиморфизма rs7516354 в интроне гена KIF26B (ООО «СибЭнзайм», кат.№ K013S).

## Результаты и обсуждение

Для оценки количества негидролизованной ДНК в ПЦР использовались значения  $C_q$ , автоматически определяемые амплификатором «Bio-Rad Real-Time CFX96».  $C_q$  определяется как количество циклов реакции, при котором кривая амплификации и прямая порога чувствительности прибора пересекаются. Величина  $C_q$  обратно пропорциональна содержанию ДНК-матрицы в образце. В таблицах 1 и 2 показаны значения  $C_q$ , полученные при ПЦР-анализе ДНК крови больных РМЖ и РЖ, соответственно (столбцы 2-4). В столбцах 5 и 6 указаны значения величин  $C_q$ , полученные в FatI- и Glal-ПЦР анализе, за вычетом значения  $C_q$  в столбике 2 (контрольный ПЦР на HaeIII-гидролизате), обозначенные как  $\Delta C_q\_T$  и  $\Delta C_q\_5mC$ , соответственно. Как видно из таблиц, по значениям  $\Delta C_q\_T$  и  $\Delta C_q\_5mC$  образцы ДНК отчетливо разбиваются на три группы величин. В первой группе значения  $\Delta C_q\_T$  и  $\Delta C_q\_5mC$  равны  $1.0 \pm 0,25$  и они отмечены светло-зеленым и желтым цветом, соответственно. Во второй группе значения  $\Delta C_q\_T$  варьирует в диапазоне  $7.5 \pm 2.5$  (темно-зеленый цвет) при значениях  $\Delta C_q\_5mC$   $0 \pm 0.27$  (голубой цвет). В третьей группе значения  $\Delta C_q\_T$ , выделенные также голубым цветом, находятся в интервале  $0 \pm 0.24$  при значениях  $\Delta C_q\_5mC$   $3,2 \pm 1.2$  (оранжевый цвет), за исключением препарата ДНК за номером 56. Очевидная трактовка полученных значений заключается в том, что в первую группу входят образцы ДНК с диплоидным набором аллелей С/Т, во вторую – с набором Т/Т, а в третью – с набором С/С.

Таблица 1. Данные ПЦР-анализа для группы женщин, больных РМЖ.

Значения Cq в случае гидролиза ДНК по сайтам GGCC (HaeIII), CATG (Fst-ПЦР анализ) и A(5mC)GC (GlaI-ПЦР анализ) и значения разницы величины Cq для двух последних реакций относительно первой ( $\Delta Cq_T = \Delta Cq_{CATG} - \Delta Cq_{GGCC}$  и  $\Delta Cq_{5mC} = \Delta Cq_{A(5mC)GC} - \Delta Cq_{GGCC}$ ), соответственно.

N образца	Возраст, лет	I Cq_GGCC	II Cq_CATG	III Cq_A(5mC)GC	$\Delta Cq_T$ (II - I)	$\Delta Cq_{5mC}$ (III-I)
РМЖ57	54	21.82±0.061	22.57±0.208	22.6±0.03	0.78	0.75
РМЖ58	59	21.79±0.153	21.77±0.149	29.35±0.578	7.56	-0.02
РМЖ59	62	22.16±0.055	25.34±0.094	22.12±0.084	-0.04	3.18
РМЖ60	60	23.22±0.093	23.39±0.228	28.98±0.139	5.76	0.17
РМЖ67	36	21.56±0.158	22.33±0.205	22.34±0.094	0.78	0.77
РМЖ72	65	22.41±0.134	23.22±0.173	23.39±0.204	0.98	0.81
РМЖ107	50	22.99±0.155	22.86±0.048	31.59±0.487	8.6	-0.13
РМЖ117	65	21.69±0.024	21.66±0.032	27.97±0.123	6.28	-0.03
РМЖ190	70	21.99±0.023	22±0.138	29.61±0.522	7.62	0.01
РМЖ191	62	20.58±0.051	21.49±0.051	21.53±0.025	0.95	0.91
РМЖ192	66	21.57±0.089	21.59±0.081	29.17±0.511	7.6	0.02
РМЖ193	69	21.75±0.121	21.86±0.153	28.45±0.085	6.7	0.11
РМЖ194	65	21.31±0.083	22.12±0.183	22.28±0.099	0.97	0.81
РМЖ196	73	22.31±0.041	24.59±0.089	22.21±0.023	-0.1	2.28
РМЖ197	65	21.55±0.106	22.56±0.109	22.54±0.121	0.99	1.01
РМЖ198	58	21.18±0.215	21.96±0.169	22.29±0.098	1.11	0.78
РМЖ199	58	21.46±0.121	21.49±0.078	29.71±0.376	8.25	0.03
РМЖ201	65	21.62±0.064	21.48±0.087	28.81±0.388	7.19	-0.14
РМЖ202	50	21.68±0.09	21.68±0.143	30.19±0.81	8.51	0
РМЖ203	78	22.24±0.115	22.3±0.074	30.8±0.582	8.56	0.06
РМЖ204	31	21.67±0.062	22.5±0.067	22.75±0.036	1.08	0.83
РМЖ206	50	21.4±0.125	22.23±0.165	22.25±0.137	0.85	0.83
РМЖ207	63	21.52±0.096	21.4±0.071	29.69±0.518	8.17	-0.12
РМЖ208	67	21.6±0.047	22.46±0.043	22.58±0.053	0.98	0.86
РМЖ292	62	21.98±0.207	23.02±0.005	23.17±0.064	1.19	1.04
РМЖ293	62	22.35±0.105	22.32±0.007	28.77±0.292	6.42	-0.03
РМЖ294	71	22.12±0.028	23.1±0.106	23.16±0.098	1.04	0.98
РМЖ295	62	22.32±0.036	22.11±0.222	30.97±0.64	8.65	-0.21
РМЖ296	58	21.3±0.068	22.04±0.024	22.13±0.093	0.83	0.74
РМЖ297	70	20.7±0.092	20.57±0.051	28.56±0.617	7.86	-0.13
РМЖ298	58	21.54±0.103	21.4±0.098	28.92±0.289	7.38	-0.14
РМЖ299	64	21.71±0.021	21.55±0.048	30.02±0.263	8.31	-0.16
РМЖ300	66	22.1±0.126	23.11±0.054	22.95±0.028	0.85	1.01
РМЖ301	44	21.63±0.18	22.44±0.113	22.74±0.125	1.11	0.81
РМЖ302	63	21.71±0.089	22.68±0.196	22.84±0.04	1.13	0.97
РМЖ303	58	21.71±0.113	25.06±0.103	21.57±0.066	-0.14	3.35
РМЖ304	41	21±0.069	21.58±0.117	21.85±0.196	0.85	0.58
РМЖ320	50	23.24±0.045	24.24±0.148	24.28±0.084	1.04	1
РМЖ321	48	23.22±0.04	23.09±0.082	29.61±0.692	6.39	-0.13
РМЖ322	48	21.59±0.203	22.45±0.188	22.46±0.166	0.87	0.86
РМЖ323	63	22.44±0.086	22.28±0.037	28.35±0.173	5.91	-0.16

РМЖ324	63	22.3±0.092	23.06±0.035	23.4±0.098	1.1	0.76
РМЖ325	42	21.39±0.109	22.3±0.021	22.27±0.056	0.88	0.91
РМЖ326	69	22.11±0.019	22.18±0.167	28.66±0.383	6.55	0.07
РМЖ327	62	22.67±0.096	25.64±0.096	22.44±0.09	-0.23	2.97
РМЖ328	44	22.38±0.052	22.28±0.075	29.05±1.272	6.67	-0.1
РМЖ329	61	22.17±0.079	23.03±0.048	23.06±0.013	0.89	0.86
РМЖ330	71	22.06±0.066	22.69±0.119	22.99±0.108	0.93	0.63
РМЖ331	67	21.63±0.118	22.48±0.048	22.58±0.046	0.95	0.85
РМЖ332	63	21.29±0.162	22.09±0.193	22.34±0.091	1.05	0.8
РМЖ333	66	21.32±0.075	24.66±0.041	21.1±0.158	-0.22	3.34

Таблица 2. Данные ПЦР-анализа для группы больных РЖ.

Обозначения, как в таблице 1.

№ образца	Возраст, лет	Пол	I Cq_GGCC	II Cq_CATG	III Cq_A(5mC)GC	ΔCq_T (II - I)	ΔCq_5mC (III-I)
РЖ38	60	ж	20.71±0.139	21.49±0.191	21.56±0.056	0.78	0.85
РЖ41	47	ж	22.08±0.102	27.23±0.25	21.93±0.193	5.15	-0.15
РЖ43	59	м	22.24±0.071	23.31±0.023	23.02±0.055	1.07	0.78
РЖ45	51	м	22.72±0.142	32.35±1.843	22.5±0.092	9.63	-0.22
РЖ47	62	м	20.37±0.086	21.38±0.07	21.37±0.1	1.01	1
РЖ49	46	м	21.28±0.081	28.17±0.139	21.38±0.068	6.89	0.1
РЖ50	53	м	22.11±0.146	23.09±0.051	23.02±0.15	0.98	0.91
РЖ51	77	м	21.1±0.133	28.24±0.361	20.96±0.056	7.14	-0.14
РЖ54	70	ж	20.62±0.057	21.85±0.07	21.54±0.133	1.23	0.92
РЖ80	72	м	22.58±0.091	23.58±0.07	23.79±0.142	1	1.21
РЖ98	52	м	21.33±0.068	22.23±0.077	22.16±0.013	0.9	0.83
РЖ99	56	м	24.62±0.142	25.84±0.077	25.48±0.097	1.22	0.86
РЖ132	75	ж	21.08±0.028	28.96±0.596	20.92±0.152	7.88	-0.16
РЖ133	72	ж	21.88±0.141	22.94±0.076	22.69±0.168	1.06	0.81
РЖ146	80	м	22.84±0.118	23.63±0.058	23.73±0.084	0.79	0.89
РЖ148	61	м	21.27±0.06	28.37±0.325	21.37±0.165	7.1	0.1
РЖ149	83	м	20.79±0.05	28.11±0.132	20.6±0.098	7.32	-0.19
РЖ150	57	м	21.37±0.024	27.21±0.589	21.35±0.073	5.84	-0.02
РЖ151	50	м	20.22±0.115	21.17±0.06	21.06±0.126	0.95	0.84
РЖ154	61	м	20.95±0.05	22.07±0.05	21.9±0.218	1.12	0.95
РЖ156	70	м	20.59±0.132	27.34±0.126	20.59±0.043	6.75	0
РЖ157	37	м	21.91±0.144	23.1±0.116	22.87±0.124	1.19	0.96
РЖ 158	76	ж	22.16±0.044	30.49±1.099	22.17±0.177	8.33	0.01
РЖ161	49	м	20.85±0.185	21.85±0.04	21.76±0.069	1	0.91
РЖ182	54	м	20.21±0.054	21.31±0.036	21.26±0.116	1.1	1.05
РЖ184	69	м	21.16±0.058	30.1±0.264	21.13±0.111	8.94	-0.03
РЖ185	69	м	21.42±156	29.14±1.04	21.48±82	7.72	0.06
РЖ186	59	ж	21.19±0.029	21.95±0.181	22.07±0.165	0.88	0.76
РЖ187	70	ж	21.06±0.044	22.02±0.108	21.91±0.181	0.96	0.85
РЖ209	59	ж	21.06±0.02	21.82±0.163	22.05±0.175	0.99	0.76
РЖ211	65	ж	21.53±0.13	30.17±0.719	21.41±0.07	8.64	-0.12
РЖ214	82	ж	21.71±0.064	28.38±0.625	21.79±0.059	6.67	0.08
РЖ215	81	ж	21.34±0.086	22.22±0.026	22.22±0.128	0.88	0.88

РЖ220	48	м	20.58±0.043	21.49±0.007	21.76±0.163	0.91	1.18
РЖ224	57	м	21.57±0.136	29.9±0.476	21.48±0.148	8.33	-0.09
РЖ225	72	ж	21.59±0.096	29.69±0.964	21.58±0.162	8.1	-0.01
РЖ227	79	м	21.5±0.081	29.63±0.38	21.47±0.089	8.13	-0.03
РЖ 230	63	ж	21.73±0.121	22.73±0.125	22.57±0.125	1	0.84
РЖ 232	64	ж	22.39±0.084	22.36±0.092	25.09±0.033	-0.03	2.7
РЖ 233	62	ж	21.17±0.048	22.17±0.064	21.93±0.077	1	0.76
РЖ 234	61	м	21.21±0.039	22.13±0.047	22.15±0.107	0.94	0.92
РЖ243	75л	м	23.07±0.047	24.04±0.007	23.87±0.195	0.97	0.8
РЖ250	67	м	22.73±0.163	29.5±0.41	22.56±0.049	6.77	-0.17
РЖ276	35	ж	21.23±0.058	26.34±0.982	21.29±0.107	5.11	0.06
РЖ277	72	ж	21.34±0.09	21.36±0.025	24.08±0.11	0.02	2.74
РЖ280	67	м	22.34±0.122	23.4±0.031	23.11±0.069	1.06	0.77
РЖ282	68	ж	21.42±0.092	22.44±0.122	22.31±0.064	1.02	0.89
РЖ284	46	м	22.56±0.065	23.74±0.186	23.35±0.076	1.18	0.79
РЖ285	71	ж	21.56±0.054	30.42±0.812	21.42±0.118	8.86	-0.14
РЖ286	66	м	21.28±0.112	21.42±0.064	24.01±0.103	0.14	2.73
РЖ287	63	м	21.17±0.128	22.18±0.072	22.06±0.023	1.01	0.89
РЖ315	74	ж	21.54±0.071	22.36±0.116	22.36±0.125	0.82	0.82
РЖ316	67	м	20.54±0.146	21.75±0.049	21.38±0.075	1.21	0.84
РЖ 317	74	м	21.62±0.037	28.98±0.159	21.47±0.022	7.36	-0.15
РЖ 318	71	м	22.39±0.041	23.62±0.127	23.26±0.05	1.23	0.87
РЖ319	57	м	21.51±0.046	29.65±0.212	21.64±0.139	8.14	0.13
РЖ334	67	ж	20.44±0.025	21.36±0.025	21.29±0.044	0.92	0.85
РЖ335	55	ж	21.52±0.025	21.35±0.2	24.21±0.035	-0.17	2.69
РЖ340	65	м	22.21±0.018	22.13±0.129	24.2±0.176	-0.08	1.99
РЖ341	74	ж	22.45±0.08	23.29±0.135	23.34±0.09	0.84	0.89
РЖ342	72	м	22.38±0.073	30.24±0.368	22.27±0.139	7.86	-0.11
РЖ343	72	м	21.58±0.107	22.35±0.022	22.43±0.066	0.85	0.77
РЖ344	62	м	22.23±0.085	30.9±1.269	22.27±0.107	8.67	0.04

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что цитозинное основание во всех гомозиготных по С образцах в значительной степени метилировано. Разница  $\Delta Cq_{5mC}$  для этих образцов составляет 1.99-3.35, что соответствует содержанию приблизительно 75%-90% метилированных сайтов в ДНК образца. Среди гетерозиготных образцов выделяются образцы РМЖ 304 и РМЖ 330, в которых метилирование выражено слабее, чем в остальных образцах.

Разницы  $\Delta Cq$  позволяют определить количество гомо- и гетерозигот в выборках больных РМЖ и РЖ и сравнить эти данные с результатами, полученными ранее для здоровых людей [1]. В таблице 3 приведено такое сравнение.

**Таблица 3.**

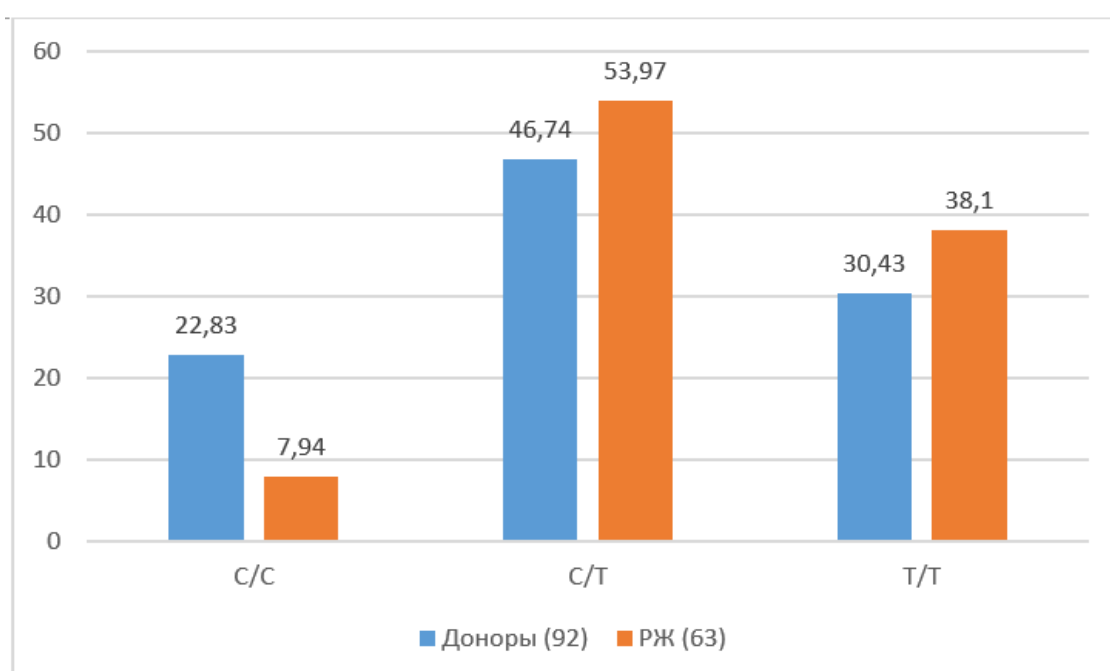
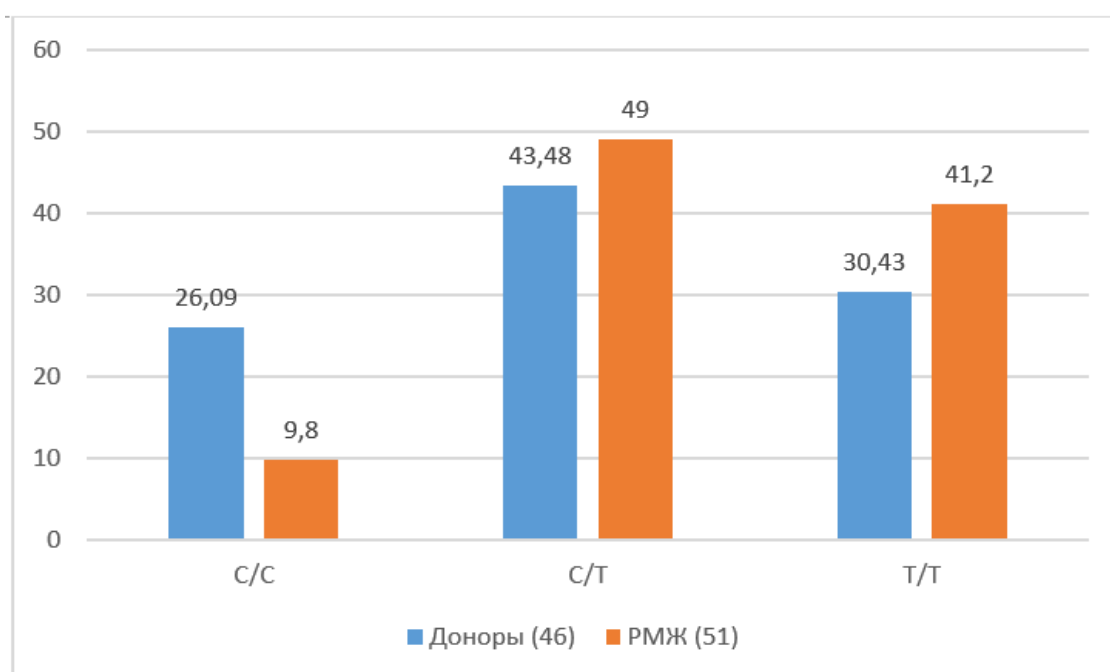
Распределение диплоидных наборов аллелей в позиции chr1: 245618129 у здоровых людей и больных РМЖ и РЖ. Приведены значения в процентах, в скобках указано количество людей с данным диплоидным набором.

Диплоидный набор	Доноры (46, женщины)	РМЖ (51)	Доноры (92, оба пола)	РЖ (63)
C/C	26.09 (12)	9.8 (5)	22.83 (21)	7.94 (5)
C/T	43.48 (20)	49 (25)	46.74 (43)	53.97 (34)
T/T	30.43 (14)	41.2 (21)	30.43 (28)	38.1 (24)

На рисунке 1 полученные расчеты представлены в виде диаграмм.

**Рисунок 1**

Сравнение долей (в процентах) различных вариантов диплоидных наборов аллелей в позиции chr1: 245618129 у здоровых доноров и больных РМЖ (вверху) и РЖ (внизу).



Из полученных данных следует, что соотношения различных вариантов сочетаний аллелей С и Т существенно различаются у здоровых доноров и людей с одним из двух онкологических заболеваний. Это выражается в том, что доля генотипа С/С у больных меньше в 2.7-2.9 раз по сравнению со здоровыми донорами. При этом у групп больных наблюдается увеличение людей с генотипами С/Т и Т/Т.

Таким образом, наличие у людей генотипа Т/Т в положении chr1: 245618129 является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о предрасположенности к РМЖ и РЖ, и в 2.7-2.9 раз увеличивающим риск возникновения заболевания по сравнению с носителями генотипа С/С. В публичном архиве ClinVar [7], содержащем данные об исследованиях взаимосвязи генетических вариаций с различными заболеваниями, отсутствуют сведения об известных патологиях, связанных с однонуклеотидным полиморфизмом rs7516354. Отсутствие данных о патологиях, связанных с этим полиморфизмом, вероятно связано с различием частот аллелей в положении chr1: 245618129 в различных популяциях. В частности доля С в положении chr1: 245618129 варьируется от 0,129 у восточных азиатов до 0,635 у африканцев [1].

## Литература

1. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. (2021) Определение полиморфизма 5mC/T в позиции Chr1: 245618129 в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и FatI-ПЦР анализа, Эпигенетич ДНК диагност, том 2021(1).
2. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-311.
3. Teng Y, Guo B, Mu X, Liu S. KIF26B promotes cell proliferation and migration through the FGF2/ERK signaling pathway in breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:766-773.
4. Zhang H, Ma RR, Wang XJ, Su ZX, Chen X, Shi DB, Guo XY, Liu HT, Gao P. KIF26B, a novel oncogene, promotes proliferation and metastasis by activating the VEGF pathway in gastric cancer. *Oncogene.* 2017;36(40):5609-5619.
5. Wang J, Cui F, Wang X, Xue Y, Chen J, Yu Y, Lu H, Zhang M, Tang H, Peng Z. Elevated kinesin family member 26B is a prognostic biomarker and a potential therapeutic target for colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34(1):13.
6. А.Г. Акишев, Н.А. Нетесова, М.А. Абдурашитов, Дегтярев (2021) Определение полиморфизма 5mC/T в повторе AluSx (CHR16: 75033884) в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и FatI-ПЦР анализа, Эпигенетич ДНК диагност, том 2021(1).
7. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W, Karapetyan K, Katz K, Liu C, Maddipatla Z, Malheiro A, McDaniel K, Ovetsky M, Riley G, Zhou G, Holmes JB, Kattman BL, Maglott DR. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067.