

Ф.Г. Иванова, Н.В. Чердынцева, А.В. Хрунин, В.А. Горбунова

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CYP2E1 И ПЕРЕНОСИМОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА ЯИЧНИКОВ

УДК 611.651:616-006(571.56)

Проведен анализ ответа на химиотерапию и полиморфизма гена CYP2E1 в группах больных раком яичников и здоровых женщин якутской этнической группы. Выявлены существенные различия по частоте встречаемости аллеля *CYP2E1*1D* (вставка 96 п.о. в промоторной области гена). Более высокое его содержание отмечено в группе здоровых женщин.

Ключевые слова: ДНК полиморфизм, CYP2E1, химиотерапия, рак яичников, якуты.

The response to chemotherapy and CYP2E1 polymorphism gene in groups of ovarian cancer patients and healthy women of Yakut ethnic group was analyzed. Significant differences in the frequency of allele *CYP2E1*1D* (96 bp insertion in the promoter region of the gene) were revealed. The higher content was observed in the group of healthy women.

Keywords: DNA polymorphisms, CYP2E1, chemotherapy, ovarian cancer, Yakuts.

Введение. В связи с бурным развитием молекулярно-генетических исследований в онкологии индивидуализация лечения злокачественных новообразований становится всё более актуальным вопросом. Этнические различия в риске формирования злокачественных новообразований различных локализаций связаны как с факторами среды и образа жизни, так и с генетически детерминированными особенностями функционирования патогенетически значимых генов. Исход онкологического заболевания обусловлен двумя основными группами факторов: биологическими особенностями злокачественного процесса, определяющими риск прогрессирования, и эффективность лечения. В последние годы появились данные о том, что ассоциированные с этносами генетические различия вносят существенный вклад в характер опухолевой прогрессии (клиническое течение заболевания) и в ответ на специфическую противоопухолевую терапию, обеспечивая разную ее эффективность и переносимость в зависимости от расовой (этнической) принадлежности. Однако неоднозначность, а иногда и противоречивость результатов, полученных разными авторами, делает актуальным проведение дальнейших исследований в этой области с целью установления этно-специфических

генетических особенностей, которые, с одной стороны, позволяют оптимизировать лекарственное лечение у определенных групп больных, а с другой – обеспечат продвижение на пути к индивидуализации противоопухолевого лечения [1].

Ген *CYP2E1* кодирует один из важнейших ферментов системы цитохрома P450. Его доля составляет около 7% всех изоформ цитохрома P450, конститтивно экспрессирующихся в печени человека. *CYP2E1* играет существенную роль в метаболизме таких эндогенных субстратов, как этанол и ацетон. Однако этим его функциональная значимость не исчерпывается, так как ввиду своей широкой субстратной специфичности он способен участвовать в метаболизме более чем 80 соединений, с которыми сталкивается современный человек. Среди них не только лекарственные препараты, но и целый ряд высокотоксичных соединений, обладающих, в том числе, и канцерогенными свойствами (винилхлорид, нитрозамины и др.) [2,6]. Помимо прочего реакции, катализируемые *CYP2E1*, сопровождаются образованием значительного количества активных форм кислорода, также способных запускать процессы, приводящие к опухолевой трансформации клеток [3].

Цель исследования – изучение взаимосвязи полиморфизма гена *CYP2E1* с переносимостью химиотерапии и риском развития рака яичников.

Материалы и методы исследования. Для проведения исследований служила геномная ДНК, полученная из лейкоцитов периферической крови не являющихся родственниками женщин якутского происхождения. Этническая принадлежность определялась путем анкетирования: в исследование включались лишь женщины, в роду которых до второго поколения включительно

отсутствовали межэтнические браки и предки которых проживали на территории Якутии. Выборка больных была сформирована из женщин с верифицированным раком яичников, получавших химиотерапию по стандартной схеме Цисплатин 100 мг/м² в 1-й день, Циклофосфан 600 мг/м² в 1-й день на базе ГБУ «Якутский республиканский онкологический диспансер». Итоговая группа больных составила 88 чел. В контрольную группу было включено 98 чел. Выделение и очистку образцов ДНК осуществляли стандартным методом, основанным на использовании протеиназы К с последующей фенол хлороформной экстракцией [12]. Амплификацию участков ДНК, содержащих исследуемые полиморфные сайты, и их генотипирование проводили с использованием праймеров и рестриктаз [7]. Статистическую обработку результатов генотипирования проводили с использованием программ PowerMarker 3.25 (тестирование распределения частот генотипов на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, сравнение распределений генотипов и аллелей в группах больных и контроля [9]) и GraphPad InStat 3.00 (расчет величин отношения шансов (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA)). Переносимость химиотерапии анализировалась по рекомендациям ВОЗ.

Результаты и обсуждение. Изучение вклада *CYP2E1* в патогенез различных форм рака позволило выявить ассоциации между отдельными полиморфными вариантами гена и риском развития тех или иных злокачественных новообразований. Однако в большинстве работ наиболее частым предметом исследований был так называемый «*PstI/RsaI* полиморфизм» – два сцепленных однонуклеотидных полиморфных сайта, локализованных в промоторной области гена *CYP2E1*

ИВАНОВА Феодосия Гаврильевна – к.м.н., зав. лаб. ЯНЦ КМП СО РАМН, зав. отд. химиотерапии ГБУ ЯРОД, гл. внешштат. онколог МЗ РС(Я); **ЧЕРДЫНЦЕВА Надежда Викторовна** – д.б.н., проф., зам. директора по науке ФБГУ НИИ онкологии СО РАМН, nii@oncology.tomsk.ru; **ХРУНИН Андрей Владимирович** – к.м.н., с.н.с. ФБГУ Институт молекулярной генетики РАН, khrunin@img.ras.ru; **ГОРБУНОВА Вера Андреевна** – д.м.н., проф., руковод. отд. химиотерапии ФБГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

(rs3813867 и rs2031920), аллельный статус которых анализировался с использованием эндонуклеаз рестрикции PstI и RsaI. Функциональную значимость этого полиморфизма связывают с его влиянием на экспрессию гена. Ассоциации других полиморфных вариантов гена с риском развития опухолей изучены в меньшей степени [4,8]. В рамках настоящего исследования с целью изучения взаимосвязи полиморфизма гена *CYP2E1* с риском развития рака яичников нами проведен сравнительный анализ распределения аллелей сразу четырех его полиморфных вариантов в группах здоровых и больных раком яичников женщин из Якутии (таблица).

Исходя из того, что локусы rs2031920 и rs3813867 являются полностью сцепленными, в нашем исследовании анализировался полиморфизм лишь одного из них – rs3813867. Ввиду отсутствия редких гомозигот в выборке больных вероятностная оценка различий распределений между группами проводилась с использованием точного теста. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Частоты встречаемости аллелей и генотипов всех изученных полиморфных локусов гена *CYP2E1* в выборках больных и контроля представлены в таблице. Распределение частот генотипов в контрольной группе по каждому из локусов соответствовало ожидаемому по закону Харди-Вайнберга.

Сравнительный анализ распределения исследованных полиморфных вариантов гена в группах больных и контроля выявил существенное различие между ними по частоте встречаемости варианта, характеризующегося наличием дополнительных 96 п.о. (таблица). В случае остальных полиморфных локусов статистически значимых различий в частотах встречаемости их аллелей и генотипов обнаружено не было.

В соответствии с существующей номенклатурой полиморфных аллелей гена *CYP2E1* этот аллельный вариант обозначается как *CYP2E1*1D*. На молекулярном уровне каждый такой аллель характеризуется присутствием двух дополнительных повторов – VII (42 п.о.) и VIII (48 п.о.) – и вставки в 6 п.о. в III повторе, составляющих в сумме 96 п.о. [5]. Аллель с шестью повторами обозначается как *CYP2E1*1C*. В исследованной группе больных раком яичников аллель *CYP2E1*1D* встречался лишь в гетерозиготном состоянии. В контрольной группе гетерозиготные генотипы также превалировали:

Исследованные полиморфизмы гена *CYP2E1**

Полиморфизм	Аллель, генотип	Больные (88 чел.)	Контроль (98 чел.)	P
Вставка 96 п.о. (5' область гена)	<i>CYP2E1*1C</i> (- 96 п.о.)	163	164	0,007
	<i>CYP2E1*1D</i> (+ 96 п.о.)	13	32	
	<i>CYP2E1*1C / CYP2E1*1C</i>	75	67	
	<i>CYP2E1*1C / CYP2E1*1D</i>	13	30	
	<i>CYP2E1*1D / CYP2E1*1D</i>	0	1	
SNP, rs3813867 (5' область гена)	G	155	178	0,606
	C	19	18	
	G/G	68	81	
	G/C	19	16	
	C/C	0	1	
SNP, rs6413432 (инtron 6)	T	155	168	0,440
	A	21	28	
	T/T	67	72	
	T/A	21	24	
	A/A	0	2	
SNP, rs2070676 (инtron 7)	C	167	181	0,400
	G	9	15	
	C/C	79	83	
	C/G	9	15	
				0,384

* SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм.

гомозиготный по аллелю *CYP2E1*1D* генотип был идентифицирован лишь у одной женщины. В отличие от группы больных раком яичников, зафиксированные в контрольной группе частоты встречаемости аллелей и генотипов были близки к описанным в других исследованиях [5]. Приводимые результаты относятся, главным образом, к популяциям азиатского происхождения. Частота встречаемости аллеля *CYP2E1*1D* у европеоидов существенно ниже [8]. Для количественной оценки выявленных межгрупповых различий нами также был проведен расчет «отношений шансов» (odds ratios, OR). Результаты расчетов свидетельствуют о более высоком риске развития рака яичников у женщин, гомозиготных по *CYP2E1*1C* аллелю ($OR = 2.67$, CI 1.291 – 5.521).

В настоящее время стандартные дозы химиопрепаратов применяются для лечения онкологических больных, принадлежащих к различным этническим группам, без учета межпопуляционных фармакокинетических и фармакодинамических отличий. В то же время этно-специфические различия в функционировании генов, вовлеченных в метаболизм препаратов, могут существенно влиять как на переносимость, так и эффективность цитостатического лечения. Наиболее важными в определении противоопухолевой эффективности и токсичности являются гены ферментов метаболизма ксенобиотиков – (цитохромов p450 (*CYP*), глутатионтрансфераз (glutathione-S-transferase, *GST*) разных классов, генов reparации ДНК, генов контроля

клеточного цикла, генов множественной лекарственной резистентности [1]. Полиморфизмы в этих генах могут модулировать токсичность и эффективность препаратов у представителей разных этносов в условиях влияния специфичных для той или иной популяции внешних факторов на биодоступность и метаболизм цитостатиков.

Выявленная ассоциация может быть следствием различий в функциональной активности анализируемых полиморфных вариантов гена *CYP2E1*. Имеющиеся данные свидетельствуют в пользу данного предположения. Так, в экспериментах *in vitro* *CYP2E1*1D* вариант демонстрировал несколько большую транскрипционную активность [15]. Однако данный эффект может быть не столь очевиден, особенно с позиций того, что рассматриваемые различия во влиянии *CYP2E1*1D* и *CYP2E1*1C* последовательностей на транскрипционную активность гена могут быть связаны с их различиями как супрессоров [13]. Предполагается, что различные активаторы и супрессоры могут в разной степени влиять на проявляемую *CYP2E1*1D* и *CYP2E1*1C* супрессорную активность. Последняя, очевидно, также может варьировать на фоне различий в экологии среды обитания и связанных с ними особенностях питания [8, 11]. Так, исследованные в данной работе группы женщин из Якутии, как минимум, проживают в более суровых климатических условиях в сравнении с японцами, у которых риск развития рака пищевода и толстой кишки был ассоциирован с *CYP2E1*1D* вариантом [9, 14].

Сравнительное исследование переносимости и эффективности препаратов цисплатина в зависимости от полиморфных вариантов генов ферментов детоксикации ксенобиотиков глутатион-S-трансфераз и генов репарации ДНК было проведено в группах больных раком яичников из якутской и русской популяций. Химиотерапия проводилась по стандартным схемам с включением циклофосфамида и цисплатина. Осуществлено генотипирование 10 генов по 21 полиморфизму в сопоставлении с показателями эффективности и токсичности. Для выборки пациентов европеоидного происхождения показана ассоциация полиморфизма гена *GSTP1* (Ile105Val) с показателями безрецидивной выживаемости, *GSTA1*(-69C>T, rs3957357) – показателями общей выживаемости. Существенный вклад в токсичность (нейтропения, анемия, нейропатия, тромбоцитопения) вносили полиморфизмы генов *GSTM1*(gene deletion), *GSTM3* (intron6, AGG-, rs1799735), *XRCC1* (Arg399Gln, rs25487), *ERCC1*(Asn118Asn, rs11615), *ERCC1* (C/A, rs 3212986), *TP53*(Arg72Pro), *XPD* (Asp312Asn, rs1799793). У пациентов из якутской популяции показана связь с токсичностью полиморфизмов генов *GSTA1*, *GSTM1*, *ERCC2*, в то время как на показатели выживаемости влияла изменчивость генов *GSTM2*, *ERCC1*, *CYP2E1*, *ERCC2*. Показано также, что побочные эффекты у якутов возникали достоверно чаще, тогда как частота ремиссий у них была ниже, чем у славянских женщин.

Заключение. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о генетически обусловленных этнических различиях в особенностях клинического течения злокачественных новообразований различных локализаций, показателях выживаемости, эффективности и переносимости лекарственной терапии. В настоящее время делаются лишь первые шаги по накоплению сведений о патогенетически значимых для опухолевой прогрессии и фармакологического от-

вета генетических вариациях, вносящих вклад в клинический результат у представителей различных этнических групп. В качестве одного из возможных эффективных доклинических подходов по выявлению вклада межэтнических генетических различий в чувствительность к лекарственным препаратам предполагается использование линий В-лимфобластоидных клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр, которые были получены от здоровых индивидуумов 11 этнических групп при выполнении Нар-Мар проекта [1].

Обнаружение этно-специфических генетических сигнатур, которые бы описывали уникальные наборы регулирующих лекарственную чувствительность полиморфизмов, может быть конечным результатом проводимых в рамках этнической фармакогенетики исследований. Феномен этно-специфичности фармакологического ответа открывает возможности индивидуализации терапии на основе формирования определенных целевых групп больных, которые сходны по набору генотипов, вовлеченных в эффективность цитостатиков, для повышения переносимости и эффективности химиотерапии. Внедрение фармакогеномики в практику клинических испытаний увеличит шансы на разработку более безопасных и эффективных лекарственных средств для конкретных групп больных.

Литература

- R. Thier // Int Arch Occup Environ Health. - 2003. V. 76, № 3. - P. 174-85.
3. Caro A.A. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of *CYP2E1* /A.A. Caro, A.I.Cederbaum// Annu Rev Pharmacol Toxicol. – 2004. – V. 44. – P. 27-42.
4. Danko I.M. Association of *CYP2E1* gene polymorphism with predisposition to cancer development / I.M. Danko, N.A. Chaschin. // Exp Oncol. – 2005. – V. 27, № 4. – P. 248-56.
5. Fritsche E. Localization, sequence analysis, and ethnic distribution of a 96-bp insertion in the promoter of the human *CYP2E1* gene / E. Fritsche, G.S. Pittman, D.A. Bell// Mutation Research Genomics. - 2000. - V. 432. - P. 1-5.
6. Gemma S. Individual susceptibility and alcohol effects:biochemical and genetic aspects /S. Gemma, S. Vichi, E. Testai // Ann Ist Super Sanita. – 2006. – V. 42, № 1. – P. 8-16.
7. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients /A.V. Khrunin, A.Moisseev, V. Gorbunova [et al.] //Pharmacogenomics J. - 2010. - V. 10, № 1. - P. 54-61.
8. Genetic polymorphism in *CYP2E1*: Population distribution of *CYP2E1* activity / P. Neafsey, G. Ginsberg, D. Hattis [et al.] // J Toxicol Environ Health B Crit Rev. - 2009. - V. 12, № 5-6. - P. 362-88.
9. Genetic polymorphisms of *CYP2E1* and risk of colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study / M. Morita, L. Le Marchand, Kono S. [et al.]// Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. - 2009. - V. 18, № 1. - P. 235-41.
10. Liu K. Power Marker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis / K. Liu, S.V. Muse // Bioinformatics. - 2005. - V. 21, № 9. - P. 2128-9.
11. Marchand L.L. Genetic and dietary predictors of *CYP2E1* activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. / L.L. Marchand, G.R. Wilkinson, L.R. Wilkens// Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. - 1999. - V. 8, № 6. - P. 495-500.
12. Milligan B.G. Total DNA isolation / B.G. Milligan // Molecular genetic analysis of populations / Ed. by A.R. Hoelzel. - London: Oxford University Press, 1998. - P. 29-60.
13. Role of the genetic polymorphisms in the 5'-flanking region for transcriptional regulation of the human *CYP2E1* gene / T. Uchimoto, S. Itoga, M. Nezu, M. Sunaga [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. - 2007. - V. 31, № 1 Suppl. - P. S36-42.
14. Tandem repeat polymorphism of the *CYP2E1* gene: an association study with esophageal cancer and lung cancer / S. Itoga, F. Nomura, Y. Makino [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. - 2002. - V. 26, № 8 Suppl. - P. 15S-19S.
15. Transcriptional activity of the tandem repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the human *CYP2E1* gene / F. Nomura, S. Itoga, T. Uchimoto [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. - 2003. - V. 27, № 8 Suppl. - P. 42S-46S.