

Н.В. Севостьянова, А.М. Некрасова, А.П. Кошель, А.И. Дмитриева,
С.И. Мартов, С.С. Клоков, С.С. Ракитин

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК И ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

УДК 575.174.015.3:578.264.2:579.254.2
:616.33-006.6

Цель исследования. Изучение (оценка) соотношения патологического и нормального генотипов генов эксцизионной репарации ДНК *hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC2* и генов *GSTT1*, *GSTM1* у больных раком желудка.

Материал и методы. В работе обследовано 90 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка. Злокачественные неоплазии были представлены в основном аденокарциномами различной степени дифференцировки (83,3%), перстневидноклеточным (7,4%) и недифференцированным раком (9,3 %) желудка. У пациентов со злокачественными новообразованиями при наличии показаний хирургическое лечение дополнялось химиотерапией либо лучевой терапией. Также были обследованы 231 практически здоровый житель г. Томска, сопоставимые по полу и возрасту. Они составляли основную контрольную группу.

Полученные результаты свидетельствуют о статистически значимом увеличении частоты мажорного аллеля гена *XRCC1 C194T*, *XPB1 A751C*. Носительство мажорного аллеля по этому полиморфизму увеличивает риск развития рака желудка. Следует отметить, что в группе больных раком желудка была обнаружена новая ассоциация А аллеля гена *XPB1 A751C* с риском развития этой патологии. Данная ассоциация ранее не была установлена в этой группе онкологических больных.

Ключевые слова: полиморфизм генов, репарация ДНК, рак желудка.

To study the correlation of pathological and normal genotypes of DNA *hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC2* excision reparation genes and *GSTT1*, *GSTM1* genes in patients with gastric cancer.

Material and methods: The study included 90 patients with malignant neoplasms of the stomach. Malignant neoplasm's were represented, mainly, by adenocarcinomas of various differentiation degree (83,3%), signet ring cell carcinoma (7,4%) and non-differentiated carcinoma of the stomach (9,3%). Patients with malignant neoplasms in care of indications received surgical treatment plus chemo or radiotherapy. The main control group consisted of 231 practically healthy age and sex matched residents of Tomsk.

The results obtained are indicative of a statistically significant increase of the frequency of major allele of *XRCC1 c194T*, *XPB1 A751C* gene. Major allele carriage by this polymorphism increases risk for gastric cancer development. It should be noted that in the group of patients with carcinoma of the stomach a new association of A allele of *XPB1 A751C* gene has been revealed with a high risk for this pathology development. The given association in this group of oncologic patients was not established before.

Keywords: polymorphism of genes, DNA reparation, gastric cancer.

Актуальность

Рак желудка (РЖ) является четвертой по частоте формой злокачественных новообразований и занимает второе место в структуре общей летальности от злокачественных новообразований. Статистические данные объясняются поздним выявлением РЖ, когда основной метод радикального лечения этого заболевания, а именно хирургический, является малоэффективным. Совершенно очевидно, что для решения проблемы ранней диагностики рака желудка необходимы надежные и простые методы детекции опухолевого процесса, которые позволяли бы выявлять опухоль на доклинических стадиях [5,6]. Известно, что трансформация клеток в раковые и прогрессия онкологического процесса связаны с накоплением генетических и эпигенетических изменений в геноме [4, 9].

Апоптоз или его отдельные элементы выполняют важные физиологические функции, при этом преодоление апоптоза является необходимым условием успешного развития опухоли [3]. Один из механизмов, регулирующих эти процессы в опухоли, связан с системой ДНК репарации. В большом ряду протоонкогенов особое место занимают гены эксцизионной репарации ДНК (*hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC2*), которые способны к репарации повреждений в ДНК, возникающих в результате внешних (канцерогены, ксенобиотики, вирусы и др.) и внутренних (ошибки репликации) воздействий и удалению через апоптоз клеток, генетический аппарат которых не может быть восстановлен. Известен целый ряд мутаций, инактивирующих гены репарации. В то же время описаны распространенные полиморфизмы этих генов, возможно, влияющих на функцию их белковых продуктов, модулируя, но не устраняя полностью способность к репарации ДНК [13].

В последнее время широко проводятся исследования связи полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (клеточной детоксикации) с риском развития некоторых патологических состояний, в том числе и злокачественных новообразований. Индивидуальная чувствительность к канцерогенным

воздействиям определяется двумя основными явлениями: многостадийным характером процесса канцерогенеза и генетическим полиморфизмом факторов, играющих ведущую роль на каждом его этапе. Благодаря работе ферментов биотрансформации ксенобиотиков происходит превращение токсичных для клетки продуктов в водорастворимые нетоксичные производные. Процесс биотрансформации ксенобиотиков включает в себя две последовательные стадии (фазы). Ферменты первой фазы связывают ксенобиотики с образованием мутатогенных промежуточных метаболитов (таких, как супероксид-анион-радикал и ароматические углеводороды), которые под действием ферментов второй фазы превращаются в нетоксичные продукты и выводятся из организма. В настоящее время установлено, что ключевую роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков играют глутатион-S-трансферазы (GST), которые широко экспрессируются в тканях млекопитающих. Эти ферменты катализируют присоединение глутатиона к электрофильному центру разнообразных химических соединений, что приводит к потере токсичности и образованию более гидрофильных продуктов, которые в дальнейшем могут быть метаболизованы и выведены из клетки. GST обладают также некото-

ГУ ВПО НИИ гастроэнтерологии СибГМУ им. Г.К. Жерлова: **СЕВОСТЬЯНОВА Наталья Владимировна** – д.м.н., проф., зам. директора по НИР, e-mail: sev_nv@mail.ru; **КОШЕЛЬ Андрей Петрович** – д.м.н., проф., директор НИИ, e-mail: ark@mail.ru; **ДМИТРИЕВА Алла Ивановна** – к.м.н., с.н.с.; **КЛОКОВ Сергей Сергеевич** – к.м.н., зам. директора по клинической работе; **МАРТОВ Сергей Иванович**, **РАКИТИН Сергей Сергеевич** – аспиранты ГУ ВПО НИИ гастроэнтерологии СибГМУ; **НЕКРАСОВА Анна Михайловна** – к.м.н., врач-эксперт СК «АПРОСА».

рой пероксидазной активностью, благодаря чему играют важную роль во внутриклеточном связывании и транспорте большого числа как эндогенных, так и экзогенных соединений [1, 2].

Цель исследования – изучение (оценка) соотношения патологических и нормальных генотипов генов эксцизионной репарации ДНК *hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC2* и генов *GSTT1*, *GSTM1* у больных раком желудка.

Материал и методы исследования

В ходе работы было обследовано 90 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка, а также 231 практически здоровый житель г. Томска в качестве основной контрольной группы. Исследование выполняли с разрешения Комитета по этике Сибирского государственного медицинского университета (заключение №583 от 19.03.2007 г.). Пациенты находились на стационарном лечении в НИИ гастроэнтерологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (г. Северск) и Областном государственном учреждении здравоохранения «Томский областной онкологический диспансер» (г. Томск). Все пациенты получили хирургическое лечение, удаленные ткани забирались для гистологического исследования, которое проводилось в отделении патологической морфологии Томского областного онкологического диспансера и в отделении патологической морфологии МСЧ-81 (г. Северск).

Злокачественные неоплазии были представлены, в основном, аденокарциномами различной степени дифференцировки (83,3%), перстневидноклеточным (7,4%) и недифференцированным раком (9,3%) желудка. У пациентов со злокачественными новообразованиями, при наличии показаний, хирургическое лечение дополнялось химиотерапией либо лучевой терапией.

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводили стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки [10]. Обследованные индивиды были прогенотипированы по биаллельным полиморфизмам генов репарации ДНК (*hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*). Для типирования данных генных маркеров использованы рестрикционный анализ продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) по методикам, описанным в литературе [12, 14–16]. Образцы ДНК больных ЖКТ и здоровых доноров были протипированы также по полиморфизму генов биотрансформации: *GSTT1* и *GSTM1* (кодируют соответственно глутатион S-трансферазы $\theta 1$ и $\mu 1$). Типирование

образцов по генам *GSTT1* и *GSTM1* проводили путем мультиплексной ПЦР с использованием трех пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участку гена рецептора эстрогенов, ER, (F: 5'-caa-gtc-tcc-cct-cac-tcc-cc; R: 5'-gtg-cga-gtg-gct-cag-tgt-gt) и генов *GSTT1* (F: 5'-ggg-cat-tct-gaa-ggc-caa-gg; R: 5'-ttt-gtg-gac-tgc-tga-gga-cg), и *GSTM1* (F: 5'-tgc-ttc-acg-tgt-tat-gga-ggt-tc; R: 5'-gtt-ggg-ctc-aaa-tat-acg-gtg-g). Смесь для амплификации объемом 12 мкл содержала 100–200 нг ДНК, 2,5 нМ каждого праймера, 1 мМ смесь четырех dNTP, 1 мМ $MgCl_2$, 0,5 ед./акт. Таq ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Новосибирск) и 10×буфер, поставляемый производителем вместе с ферментом. Программа амплификации включала 5 мин предварительной денатурации при 94°C, четыре цикла: 94°C – 20 с, 65°C – 25 с, 72°C – 20 с; четыре цикла: 94°C – 20 с, 63°C – 25 с, 72°C – 20 с; 25 циклов: 94°C – 20 с, 61°C – 25 с, 72°C – 20 с. Программу завершала элонгация при 72°C в течение 3 мин. Продукты амплификации фракционировали в 3%-ном агарозном геле с бромистым этидием в течение 30 мин при напряжении 130 В и визуализировали в УФ-свете. Гомозиготность по нулевым аллелям (0/0) генов *GSTT1* и *GSTM1* определяли по отсутствию на электрофореграммах фрагментов размером 131 и 114 п.н. соответственно. Наличие этих фрагментов свидетельствовало о присутствии по крайней мере одной нормальной (без делеции) копии генов (гомо- и гетерозиготы, +/+ и +/0), результатом которой следует ожидать полноценное функционирование глутатион S-трансферазы. Поэтому группы +/+ и 0/+ для расчетов объединили в группу (+) и противопоставляли ей гомозиготу 0/0. В качестве внутреннего кон-

троля использовали амплификацию фрагмента гена *ER* размером 181 п.н. [8].

Для расчетов использовали стандартные алгоритмы биометрии, в том числе сравнение частот генотипов в группах больных и здоровых лиц с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. Относительный риск (OR) развития заболевания при определенном генотипе рассчитывался по стандартной формуле $OR = a/b \times d/c$, где *a* и *b* – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип соответственно, и *d* и *c* – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. OR указан с 95%-ным доверительным интервалом [11].

Результаты и их обсуждение

В проведенном исследовании были определены гены эксцизионной ДНК репарации (*hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC2*), которые способны к репарации повреждений в ДНК, возникающих в результате внешних и внутренних (ошибки репликации) воздействий и удалению через апоптоз клеток, генетический аппарат которых не может быть восстановлен. Репарационный потенциал каждого индивида в большой степени связан с полиморфизмом этих генов.

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей генов эксцизионной репарации (*hOGG1*, *XPB1*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC2*) у больных раком желудка и здоровых лиц

Гистологические формы	Генотипы			Аллели		P_2 ош
	CC	CT	TT	C	T	
Рак ЖКТ <i>XRCC1</i> C194T n=90	46(83,7)	2(3,6)	7(12,7)	94	16	0,0019 3,03(1,46-6,34)
P_1	0,0393	0,7855	0,0442			
<i>XRCC1</i> G280A	GG	GA	AA	G	A	P_2
n=90	48(88,9)	5(9,3)	1(1,9)	101	7	0,2566 1,77(0,71-4,56)
P_1	0,3164	0,4331	0,8870			
<i>XRCC1</i> A399G	AA	AG	GG	A	G	P_2
n=90	10(18,5)	25(46,3)	19(35,2)	45	63	0,4218 1,24(0,77-1,99)
P_1	0,9534	0,3727	0,3163			
<i>XPB1</i> A751	AA	AC	CC	A	C	P_2
n=90	28(51,9)	21(38,9)	5(9,3)	77	31	0,0260 (1,07-2,92)
P_1	0,0508	0,3953	0,1780			
<i>hOGG1</i> C326G	CC	CG	GG	C	G	P_2
n=90	35(66,0)	18(34,0)	0	88	18	0,4333 1,36(0,69-2,71)
P_1	0,4760	0,6491	0,6974			
<i>XPB</i> G1104C	GG	GC	CC	G	C	P_2
n=90	37(69,8)	16(30,2)	0	90	16	0,1927 1,55(0,82-2,96)
P_1	0,6284	0,7933	0,0719			

Примечание. P_1 - достоверность отличий для генотипов; P_2 - достоверность отличий для аллелей.

Таблица 2

Распределение генотипов и аллелей гена *CYP1A1*
у больных раком желудка и у здоровых лиц

Группы обследованных	Генотип			P	Аллели		P ₂
	Иле/Иле	Иле/Вал	Вал/Вал		Иле	Вал	
Здоровые, n=231	218 (94,4%)	13 (5,6%)	0	0,000 X ² =24,3	449 (97,2%)	13 (2,8%)	0,000 X ² =22,45
Больные раком желудка, n=90	68 (75,6%)	21 (23,3%)	1 (1,1%)		157 (87,2%)	23 (12,8%)	

Примечание. p₁ - уровень статистической значимости различий частот генотипов между группами больных раком желудка и здоровыми донорами, p₂ - уровень статистической значимости различий аллелей между группами больных раком желудка и здоровыми донорами.

Таблица 3

Частота функционально полноценных и неполноценных генотипов *GSTT1* и *GSTM1*
у больных раком желудка и здоровых доноров

Ген	Генотип	Здоровые, n=231	Больные раком желудка, n=90	X ² , P	OR(CI _{95%})
<i>GSTT1</i>	+	189 (81,8%)	80 (88,9%)	X ² = 2,72 p=0,099	
	0/0	42(18,2%)	10(11,1%)		
<i>GSTM1</i>	+	138 (59,7%)	42 (46,7%)	X ² = 3,98 p= 0,046	OR= 1,70 CW ₀ 1,01-2,85

Не было выявлено ассоциации аллелей и генотипов со злокачественными новообразованиями желудка для следующих полиморфизмов исследуемых нами генов репарации: *XRCC1 Arg399Gln*, *XPG Asp1104His* (табл. 1). Для рака желудка было установлено достоверное увеличение частоты гомозигот по мажорному аллелю гена *XRCC1 C194T* и снижение частоты гомозигот по минорному аллелю. Носительство мажорного аллеля С по этому полиморфизму увеличивает риск развития рака желудка (p=0,0019 ОШ(ДИ,95%)-3,03(1,46-6,34)).

Показано также увеличение риска возникновения рака ЖКТ у носителей мажорного аллеля А гена *XPD1 A751C* (p=0,0260 ОШ(ДИ,95%)- 1,76(1,07-2,92)). Следует отметить, что в группе больных раком желудка была обнаружена новая ассоциация А аллеля гена *XPD1 A751C* с риском развития этой патологии. Данная ассоциация ранее не была установлена в этой группе больных.

Следующая группа генов предрасположенности к развитию рака желудка это гены биотрансформации ксенобиотиков. Исследование Иле/Вал-полиморфизма гена первой фазы биотрансформации ксенобиотиков цитохрома Р-450 *CYP1A1* (замена аминокислоты изолейцина (Иле) на валин (Вал) в 462-кодоне молекулы цитохрома Р-450 в гем-связывающей области фермента, которая приводит к повышению активности фермента) было проведено у 90 больных раком желудка и 231 здорового донора (табл. 2).

Частота гетерозигот (Иле/Вал) в группе больных раком желудка статистически значимо превышала соот-

ветствующую величину в контрольной группе (23,3 и 5,6%), соответственно при p=0,000. В группе больных раком желудка был выявлен 1 носитель генотипа Вал/Вал (1,1%). Частота Вал-аллеля у больных раком желудка (12,8%) достоверно превышала аналогичный показатель в группе здоровых доноров, где она составила 2,8%. Полученные результаты несколько превышают по частоте Вал-аллеля показатели, полученные Ляховичем В.В. и соавт. (1997) для больных раком желудка (7,1%). Отношение разниц (OR), отражающее степень риска развития рака желудка для носителей Вал-аллеля равно 5,06 (CI_{95%} 2,39-10,85). При анализе частоты генотипов генов ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков у больных раком желудка (n=90) в качестве группы сравнения была использована выборка здоровых жителей г. Томска (n=231). Результаты анализа генотипов глутатионтрансферазы *GSTT1* и *GSTM1* у больных раком желудка и контрольной группы представлены в табл.3.

Частота носителей гомозигот по делеционному аллелю гена *GSTT1* (0/0) в группе больных раком желудка оказалась ниже, чем в контрольной группе (11,1 и 18,2% соответственно).

Частота 0/0-генотипа глутатион-8-трансферазы М1 в группе больных раком желудка составила 53,3%, что статистически отличается от показателя в контрольной группе (40,3%) (p=0,046). Риск развития рака желудка у здоровых носителей 0/0-генотипа *GSTM1* составляет 1,70 (CI_{95%} 1,01-2,85).

В целом полученные нами результаты исследования полиморфизма генов

ферментов биотрансформации ксенобиотиков у больных раком желудка свидетельствуют о том, что свойства факторов риска для рака желудка проявляют: патологические генотипы *CYP1A*, *GSTT1* и *GSTM1*, и гены эксцизионной репарации ДНК *XRCC1 C194T*, *XPD1 A751*. Помимо свойства факторов предрасположенности к раку желудка патологические аллели и генотипы исследованных нами генов, по-видимому, играют патогенетическую роль в становлении клинических признаков данного злокачественного процесса. Степень риска возникновения рака желудка и развития его клинических особенностей, связанная с изученными генами, зависит также и от распределения комбинации генотипов.

Литература

1. Анализ полиморфных аллелей генов, кодирующих ферменты 1-й и 2-й фазы детоксикации, у больных эндометриозом / Т.Э. Иващенко [и др.] // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 4. – с. 525 – 529.
2. Геном человека и гены «предрасположенности». (Введение в предиктивную медицину.) / В.С. Баранов [и др.]. – СПб.: Интермедика, 2000. 272с.
3. Геномная медицина и новые подходы к диагностике и лечению онкозаболеваний / В.В. Ляхович [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2004. – №2(112) – с.20-26.
4. Георгиев Г.П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей / Г.П. Георгиев // Соросовский образовательный журнал (биология). – 2000. – № 11. – с. 17 – 22.
5. Давыдов М.И. Рак легкого / М.И. Давыдов, Б.Е. Полоцкий. – М.: Медицина, 1994. – 187 с.
6. Долл Р. Причины рака / Р. Долл, Р. Пито. – Киев: Наукова думка, 1984. – 254 с.
7. Заридзе Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных новообразований / Д.Г. Заридзе // Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. – М.: Научный мир, 2000. – С. 21 – 25.
8. Изучение полиморфизма генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных раком легких / Дмитриева А.И. [и др.] // Бюллетень СО РАМН – 2004 – №1 – с.60-62.
9. Имянитов Е.Н. Молекулярная генетика опухолей человека / Е.Н.Имянитов, В.П. Калиновский, П.Г. Князев // Вопросы онкологии. – 1997. – т.43, №2. – С. 95 – 101.
10. К вопросу о генетических и эпигенетических факторах риска рака легкого/ Чердынцева Н.В. [и др.] // Молекулярная медицина – 2005 – №3 – с.49-54.
11. Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций / Дж. Флейс. М.: Финансы и статистика, 1989. – 319 с.
12. Association of the hOGG1 Ser326Cys Polymorphism with Lung Cancer Risk1 / L. Le Marchand [et al.]// Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2002. – V.11. – P. 409-412.
13. Benhamou S., Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review // Mutat. Res. – 2000. – V.462. – P. 149-158.
14. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1β on tuberculosis / R.J. Wilkinson [et al.]// J. Exp. Med. 1999. V. 189. P. 1863-1873.
15. Novoradovsky A. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in α1-antitrypsin deficiency / A. Novoradovsky, M.L. Brantly, M.A. Wacławiw // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999. V. 20 (3). P. 441-447.
16. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer / Sanyal S. [et al.] // Carcinogenesis. 2004. V.25. P.729-734.