

УДК 616.33-006.6-091.816:575.174.015.3

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА С РАЗЛИЧНЫМИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ТИПАМИ ОПУХОЛИ

Ракитин С.С., Дмитриева А.И., Новицкий В.В.,
Кузнецова И.А., Севостьянова Н.В.

ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, кафедра патофизиологии, Томск,
e-mail: rakitins@yandex.ru

В работе оценивались частоты распределения полиморфных вариантов генов репарации ДНК XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751 у больных раком желудка и у здоровых доноров с целью получения новых фундаментальных знаний о роли молекулярно-генетических маркеров в развитии рака желудка с разным гистологическим типом опухоли. Для двух генов эксцизионной репарации XRCC1 194 и XPD 751 выявлены статистически значимые отличия в сравниваемых группах, рассчитаны относительные риски развития рака желудка при носительстве минорных вариантов данных генов, оценена их статистическая ассоциация с развитием опухоли определенного гистологического типа.

Ключевые слова: рак желудка, гены репарации ДНК

Рак желудка (РЖ) – чрезвычайно актуальная проблема современной онкологии. К настоящему времени РЖ занимает четвертое место в структуре онкологической заболеваемости, уступая опухолям лёгкого, молочной железы и толстой кишки [1].

В патогенез развития злокачественных новообразований желудка вовлекается множество функционально взаимосвязанных генов, формирующих генные сети, включающих наряду с главными генами (онкогены, гены-супрессоры) второстепенные гены (гены-модификаторы) [2]. В группу генов-супрессоров опухолевого роста входят гены, кодирующие компоненты системы эксцизионной репарации ДНК, играющей важную роль в поддержании стабильности генома. Важнейшими структурными компонентами системы эксцизионной репарации ДНК являются белки, кодируемые генами XPD и XRCC1.

Продукт гена XPD (xeroderma pigmentosum group D, хромосомный локус 19q13.3) функционирует на начальном этапе синтеза всех белков клетки в качестве субъединицы комплексного белка – вспомогательного фактора РНК-полимеразы

II. Помимо этого, белок XPD является необходимым участником эксцизионной репарации нуклеотидов. Процесс эксцизионной репарации обеспечивает своевременное удаление из цепей ДНК генетических аддуктов, блокирующих последующую транскрипцию и репликацию ДНК, в случае уменьшения контроля репарации, возможно, способствует появлению нуклеотидных замен [4]. Многоплановость роли белка XPD в процессах транскрипции и репарации ДНК подчеркивается значением полиморфного статуса его гена, определяющего индивидуальные фенотипические различия и предрасположенность к онкологическим заболеваниям [10]. Полиморфизм A35931C в экзоне 23 кодирует аминокислотную замену Lys751Gln в домене связывания активатора хеликазной активности XPD. Конформационное состояние этого участка влияет на стабильность белкового комплекса, ответственного за процесс репарации [6].

Белок, кодируемый геном XRCC1 (X-ray cross-complementing group I, локус 19q13.2), является интегральным регулятором эксцизионной репарации оснований [9]. Данная система обеспечивает защиту клетки от

агрессивного воздействия факторов внешней и внутренней среды, модифицирующих азотистые основания ДНК и разрушающих ее сахарофосфатный остов. Следует отметить, что модификации оснований представляют собой наиболее распространенный тип повреждений ДНК, которые в зависимости от тканевой принадлежности клеток происходят с частотой до нескольких тысяч в сутки [8].

Полиморфные варианты гена XRCC1 (Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln) фенотипически характеризуются изменением конформации белка XRCC1, снижающего сродство к многокомпонентному белковому комплексу, участвующему в процессе репарации, уменьшая тем самым активность координатора эксцизионной репарации и предположительно снижая тем самым скорость сборки комплекса [7].

Белковые продукты генов XRCC1 и XPD, участвующие в эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов и оснований, распознают и вырезают одиночные ошибочно спаренные нуклеотиды, петли длиной в 1–3 нуклеотида и исправляют модифицированные сахарные остовы оснований [5]. Изменение конформации репарационного комплекса, обусловленное наличием генных полиморфизмов, может повлиять на индивидуальную восприимчивость к развитию злокачественных новообразований, в том числе и к возникновению рака желудка.

Важной научно-практической задачей является выявление молекулярно-генетических маркеров в развитии и формировании морфологических особенностей злокачественных новообразований желудка на основании анализа распределения полиморфных вариантов генов репарации ДНК XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751.

Решение такой задачи позволит использовать их при оценке индивидуальной предрасположенности к развитию рака желудка с целью своевременной профилактики, выбора тактики терапии и прогнозирования отдаленных результатов лечения.

Цель исследования: изучить распределение полиморфных вариантов генов репарации XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751 при раке желудка и оценить их распределение в зависимости от гистологического типа опухоли.

Материал и методы исследования

В исследование были включены 200 больных раком желудка (средний возраст 61 год), из них 131 мужчина и 69 женщин, которые находились на диспансерном учете и стационарном лечении в ОГУЗ «Томский областной онкологический диспансер». Группу сравнения составили 260 практически здоровых лиц с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Диагноз РЖ основывался на данных анамнеза и результатах рентгенологического, эндоскопического и морфологического обследований. Гистологическое исследование биопсийного и операционного материала больных (выполнено в лаборатории патоморфологии диагностического отделения ОГУЗ «Томский областной онкологический диспансер») позволило разделить всех больных раком желудка на 2 группы в соответствии с классификацией P. Laugen (1956 г.): в первую группу вошли пациенты, имеющие интестинальный гистологический тип ($n = 137$), во вторую группу – больные с диффузным типом рака желудка, представленного мелко-, полиморфно-, и перстневидноклеточным раком ($n = 63$).

Материалом для исследования полиморфизмов генов эксцизионной репарации XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751 явилась ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови методом осаждения ДНК на сорбенте (набор «ДНК-сорб-АМ», ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

Образцы ДНК больных раком желудка и здоровых доноров были протипированы по полиморфизму четырех генов репарации XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751 путем полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с гибридизационно-

флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием четырех пар олигонуклеотидных праймеров и зондов [3].

Результаты и обсуждение

При анализе частоты встречаемости полиморфных вариантов генов XRCC1 G280A и XRCC1 G399A больных раком желудка и здоровых лиц значимых отличий в распре-

делении вариантных генотипов выявлено не было (табл. 1).

Также не выявлена статистическая ассоциация при анализе распределения генотипов генов XRCC1 G280A и XRCC1 G399A у больных с разными гистологическими типами опухоли при сравнении частот как внутри групп больных, так и с частотой встречаемости генотипов здоровых доноров (табл. 2).

Таблица 1

Распределение вариантных генотипов (в абс. знач. и в %) гена XRCC1 280, XRCC1 399, XRCC1 194 и XPD 751 у больных раком желудка и здоровых лиц

Ген	Генотип	Здоровые лица, n = 260		Больные раком желудка, n = 200		χ^2 , p	OR (CI _{95%})
		n	%	n	%		
XRCC1 280	GG	237	91,2	176	88,0	$\chi^2 = 4,34$ $p = 0,114$	Не опред.
	GA	23	8,8	21	10,5		
	AA	0	0	3	1,5		
XRCC1 399	GG	167	64,2	115	57,5	$\chi^2 = 0,26$ $p = 2,64$	Не опред.
	GA	72	27,7	62	31,0		
	AA	21	8,1	23	11,5		
XRCC1 194	CC	242	93,1	167	83,5	$\chi^2 = 11,5$ $p = 0,003$	2,85 (1,59-6,88) 6,42 (4,31-9,09)
	CT	18	6,9	31	15,5		
	TT	0	0	2	1		
XPD 751	AA	209	80,4	93	46,5	$\chi^2 = 68,72$ $p = 0,000$	3,16 (2,57-8,41) 14,4 (3,76-22,67)
	AC	44	16,9	62	31,0		
	CC	7	2,7	45	22,5		

Примечание: p – достоверность различий показателей по сравнению с их значениями у здоровых доноров; χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов; OR – критерий отношения шансов, отражающий относительный риск развития заболевания при определенном генотипе по сравнению со здоровыми донорами с 95%-м доверительным интервалом.

В результате проведенного анализа (см. табл. 1) распределения полиморфных вариантов гена XRCC C194T показано статистически значимое увеличение частоты встречаемости аллеля T в группе больных РЖ в гетеро- и гомозиготном состоянии по сравнению с частотой встречаемости СТ и ТТ генотипов в группе здоровых лиц. Частота встречаемости генотипа СТ в группе боль-

ных РЖ составила 15,5 и 6,92% в группе здоровых доноров. Риск развития РЖ при носительстве СТ-генотипа у здоровых лиц увеличивается почти в 2,5 раза.

Согласно полученным нами данным, (см. табл. 2), в группе больных с диффузным типом РЖ выявлено статистически значимое ($P = 0,000$) увеличение частоты встречаемости СТ и ТТ генотипов (25,4 и 1,59%)

по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц (6,92 и 0% соответственно). Также отмечалось увеличение в два раза частоты встречаемости СТ и ТТ генотипов

(25,4 и 1,59% соответственно) у больных диффузным РЖ по сравнению с таковой у пациентов с интестинальной формой опухоли (10,95 и 0,73% соответственно).

Таблица 2

Частота встречаемости вариантных генотипов (в абс. знач. и в %) генов XRCC1 280, XRCC1 399, XRCC 194и XPD 751 у больных раком желудка (РЖ) с разными гистологическими типами опухоли и у здоровых доноров

Ген	Генотип	Здоровые лица, n = 260		Больные интестинальным РЖ, n = 137		P1	Больные диффузным РЖ, n = 63		P2
		n	%	n	%		n	%	
XRCC1 280	GG	237	91,2	123	89,8	0,056 $\chi^2=5,782$	53	83,7	0,144 $\chi^2 = 3,879$ P* = 0,131 $\chi^{2*} = 4,065$
	GA	23	8,8	11	8,0		10	16,3	
	AA	0	0	3	2,2		0	0	
XRCC1 399	GG	167	64,2	80	58,4	0,387 $\chi^2 = 1,898$	35	55,6	0,425 $\chi^2 = 1,709$ P* = 0,890 $\chi^{2*} = 0,234$
	GA	72	27,7	41	29,9		21	33,3	
	AA	21	8,1	16	11,7		7	11,1	
XRCC1 194	CC	242	93,1	121	88,3	0,144 $\chi^2 = 3,869$	46	73	0,000 $\chi^2 = 22,858$ P* = 0,025 $\chi^{2*} = 7,340$
	CT	18	6,9	15	11		16	25,4	
	TT	0	0	1	0,7		1	1,6	
XPD 751	AA	209	80,4	72	52,6	0,000 $\chi^2 = 45,25$	21	33,3	0,000 $\chi^2 = 70,44$ P* = 0,040 $\chi^{2*} = 6,429$
	AC	44	16,9	38	27,7		24	38,1	
	CC	7	2,7	27	18,7		18	28,6	

Примечание: P1 – уровень статистической значимости различий частот генотипов между группами больных с интестинальным РЖ и здоровыми донорами, P2 – уровень статистической значимости различий частот генотипов между группами больных диффузным РЖ и здоровыми донорами, P* – уровень статистической значимости различий частот встречаемости генотипов между группами больных интестинальным и диффузным гистотипами РЖ, χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов между группами больных РЖ и здоровыми донорами, χ^{2*} – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов между группами больных интестинальным и диффузным гистологическими типами РЖ.

Обращало на себя внимание отсутствие значимых отличий в распределении полиморфных генотипов у здоровых доноров и больных интестинальным типом РЖ (P = 0,144).

Согласно полученным результатам, представленным в табл.1, частота встреча-

емости генотипов AC и CC гена XPD 751 в группе больных РЖ составила 31 и 22,5% соответственно, которая статистически значимо превышала аналогичные показатели у здоровых индивидов (16,92 и 2,69% соответственно). У больных РЖ генотип AC встречался в 2 раза чаще, а генотип CC – в

8 раз чаще, чем у здоровых лиц. Риск развития РЖ у здоровых носителей генотипа АС составил 3,16 раза, а генотипа СС – 14,44.

При анализе распределения вариантных генотипов гена XPD 751 между группами больных диффузным и интестинальным типами РЖ было показано значимое увеличение более чем в 1,5 раза частоты встречаемости генотипов АС и СС у больных диффузным РЖ по сравнению с таковой у больных интестинальным типом опухоли. Установлено, что частота встречаемости генотипов АС и СС у больных диффузным РЖ (38,10 и 28,57% соответственно) оказалась выше, чем у здоровых лиц (16,92 и 2,69% соответственно) при $P < 0,05$. OR диффузного РЖ для носителей генотипа АС – 5,4, СС-генотипа – 25,6.

Показано, что при распределении вариантных генотипов гена XPD A751C у больных интестинальным РЖ частота встречаемости АС-генотипа обнаруживалась чаще в 1,6 раза, СС-генотипа – более чем в 7 раз, чем у здоровых лиц ($P = 0,000$). Наличие генотипа АС и СС у носителей увеличивает риск интестинального типа РЖ в 2,5 и 11 раз соответственно.

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что полиморфные варианты генов эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований ДНК XRCC1 C194T и XPD A751C статистически ассоциированы с развитием рака желудка. На основании полученных результатов при изучении распределения вариантных генотипов в зависимости от гистологического типа опухоли можно констатировать, что минорные варианты генотипов генов XRCC1 C194T и XPD A751C статистически ассоциированы в большей степени с развитием диффузного РЖ. Выявленные отличия в распределении вариантных генотипов, кодирующих отдельные структурные единицы сложного комплекса, участвующего в эксцизионной репарации ДНК, могут свидетельствовать о высоком уровне взаимодействия его компонентов. Результаты данной работы могут быть положены в основу

разработки молекулярно-генетических методов ранней диагностики, направленных на выявление групп повышенного риска развития РЖ с целью дальнейшего проведения в них профилактических мероприятий.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы ГК № П 805 от 17.08.2009 г.

Список литературы

1. Анисимов В.Н. Старение и канцерогенез: роль генетических и канцерогенных факторов // Тезисы Российской конференции по фундаментальной онкологии. – М., 2005. – С. 4–5.
2. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко И.Н. Геном человека и гены «предрасположенности» (введение в предиктивную медицину). – Санкт-Петербург: Интермедика, 2000. – 272 с.
3. Заридзе Д. Г. Канцерогенез. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
4. Литвяков Н. В., Фрейдин М. Б. Взаимосвязь генного полиморфизма с риском развития злокачественных новообразований в условиях низкоинтенсивного радиационного воздействия // Экологическая генетика человека. – 2009. – Т. 7, № 4. – С. 24–33.
5. Мансурова Г.Н., Иванина П.В., Литвяков Н.В. Хромосомные aberrации и полиморфизм генов эксцизионной репарации у работников СХК с онкологическими заболеваниями // Сибирский онкологический журнал. – 2008. Приложение № 1. – С. 84–85.
6. Benhamou, S. ERCC2/XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review / S. Benhamou, A. Sarasin // American Journal of Epidemiology. – 2005. – Vol. 161, № 1. – P. 1–14.
7. Brem, R. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells / R. Brem, J. Hall // Nucleic Acids Research. – 2005. – Vol. 33, № 8. – P. 2512–2520.
8. Schärer, O. D. Chemistry and biology of DNA repair // Angewandte Chemie International Edition. – 2003. – Vol. 42, № 26. – P. 2946–2974.
9. Wood, R. D. Human DNA repair genes / R. D. Wood., M. Mitchell, J. Sgouros, T. Lindahl // Science. – 2001. – Vol. 291, № 5507. – P. 1284–1289.
10. Wu, X. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes / X. Wu, J. Gu, H. B. Grossman et al. // American Journal of Human Genetics. – 2006. – Vol. 78, № 3. – P. 464–479.

Рецензенты:
Рыжаков Василий Михайлович, д.м.н., зав. радиологическим отделением ОГУЗ «Томский областной онкологический диспансер»;
Кошель Андрей Петрович, д.м.н., профессор, директор НИИ Гастроэнтерологии им. Г.К. Жерлова, Северск.

GENETICS POLYMORPHISM OF DNA REPAIR GENES GASTRIC CANCER PATIENTS WITH DIFFERENT HISTOLOGICAL TYPES OF TUMORS

Rakitin S.S., Dmitrieva A.I., Novitsky V.V., Kuznetsova I.A., Sevostyanova N.V.
*Siberian state medical university, Department of Pathophysiology, Tomsk,
e-mail: rakitinss@yandex.ru*

We evaluated the frequency distribution of polymorphic variants in DNA repair genes XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 and XPD 751 gastric cancer patients and healthy controls, leading to new fundamental knowledge about role of molecular genetic markers of tumor development gastric cancer with different histological types of tumors. Statistically significant differences were identified in the two groups for the two excision repair gene XRCC1 194, and XPD 751, relative risks were calculated of gastric cancer in carriers of the minor variants of these genes.

Keywords: Gastric cancer, DNA repair genes