

Полиморфизм генов репарации ДНК *XRCC1 280*, *XRCC1 194*, *XRCC1 339* и *XPB 751* при раке желудка

Ракитин С.С.¹, Дмитриева А.И.¹, Новицкий В.В.¹, Кузнецова И.А.¹,
Авхименко В.А.²

Polymorphism of DNA repair genes *XRCC1 280*, *XRCC1 194*, *XRCC1 339* and *XPB 751* with stomach cancer

Rakitin S.S., Dmitriyeva A.I., Novitsky V.V., Kuznetsova I.A., Avkhimenko V.A.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² ОГУЗ «Томский областной онкологический диспансер», г. Томск

© Ракитин С.С., Дмитриева А.И., Новицкий В.В. и др.

В работе оценивались частоты распределения полиморфных вариантов генов репарации ДНК *XRCC1 280*, *XRCC1 194*, *XRCC1 339* и *XPB 751* у больных раком желудка и у здоровых доноров с целью получения новых фундаментальных знаний о развитии рака желудка и поиска молекулярно-генетических маркеров развития рака желудка. Для трех генов эксцизионной репарации (*XRCC1 280*, *XRCC1 339* и *XPB 751*) выявлены статистически значимые отличия в сравниваемых группах, рассчитаны относительные риски развития рака желудка при носительстве минорных вариантов данных генов.

Ключевые слова: рак желудка, репарация ДНК, полиморфизм, риски развития рака желудка.

We evaluated the frequency distribution of polymorphic variants in DNA repair genes *XRCC1 280*, *XRCC1 194*, *XRCC1 339* and *XPB 751* gastric cancer patients and healthy controls, leading to new fundamental knowledge and molecular genetic markers of gastric cancer. Statistically significant differences were identified in the two groups for the three excision repair gene *XRCC1 280*, *XRCC1 339* and *XPB 751*, relative risks were calculated of gastric cancer in carriers of the minor variants of these genes.

Key words: gastric cancer, DNA repair, polymorphism, odds ratio gastric cancerogenesis.

УДК 616.33-006.6:575.174.015.3:577.213

Введение

Рак желудка — чрезвычайно актуальная проблема современной онкологии. К настоящему времени он занимает четвертое место среди онкологических патологий по встречаемости, уступая опухолям легкого, молочной железы и толстой кишки [1].

Рак желудка по своей природе является многофакторным заболеванием. В его патогенез вовлекается множество функционально взаимосвязанных генов (генные сети), включающих наряду с главными (онкогены, гены-супрессоры) второстепенные гены (гены-модификаторы), эффект которых во многом определяется средовыми факторами [2]. К таким генам-модификаторам относятся гены иммунной системы, биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, имеющие важное значение для поддержания стабильно-

сти генома. В настоящее время описаны пять механизмов восстановления целостности ДНК: эксцизионная репарация оснований, эксцизионная репарация нуклеотидов, коррекция некорректных пар, прямое восстановление поврежденных оснований и репарация двунитевых разрывов ДНК. Первыми из перечисленных механизмов запускаются эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов, структурными компонентами которых являются белки, кодируемые генами *XPB* и *XRCC1*.

Продукт гена *XPB* (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 *XPB* является необходимым участником эксцизионной репарации нуклеотидов. Процесс эксцизион-

ной 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 [6]. Многоплановость роли белка XPD в процессах транскрипции и репарации ДНК подчеркивается значением полиморфного статуса его гена, определяющего межиндивидуальные фенотипические различия и предрасположенность к онкопатологиям [15]. Полиморфизм А35931С 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 [9].

Несмотря на большое количество работ, посвященных поиску ассоциации полиморфных вариантов гена XPD с развитием злокачественных новообразований результаты изысканий далеко не однозначны [4, 5, 12]. Последнее, по мнению некоторых исследователей, является отражением сложных функциональных взаимодействий белка XPD в различных клетках организма [9].

Белок, кодируемый геном XRCC1 (X-ray cross-complementing group I, локус 19q13.2), считается интегральным регулятором эксцизионной репарации оснований [14]. Данная система обеспечивает защиту клетки от агрессивного воздействия факторов внешней и внутренней среды, модифицирующих азотистые основания ДНК и разрушающих ее сахарофосфатный остов. Стоит отметить, что модификации оснований представляют собой наиболее распространенный тип повреждений ДНК и в зависимости от тканевой принадлежности клеток происходят с частотой до нескольких тысяч в сутки [13].

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 уменьшая тем самым скорость сборки комплекса [10].

Белковые продукты генов XRCC1 и XPD, участвующих в эксцизионной репарации ДНК путем удаления нуклеотидов и оснований, распознают и удаляют

одиночные, ошибочно спаренные нуклеотиды, петли длиной в 1—3 нуклеотида и исправляют модифицированные сахарные остовы оснований [5].

Известно, что патологические аллели репарационных генов повышают чувствительность клеток к повреждающим агентам и риску возникновения опухолевой трансформации. Некоторые авторы [8] полагают, что полиморфные варианты белковых продуктов генов XRCC1 (Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln) и XPD (Lys751Gln) могут повлиять на индивидуальную восприимчивость к развитию злокачественных новообразований, в том числе и к возникновению рака желудка (РЖ).

Важной научно-практической задачей является определение молекулярно-генетических маркеров патологии желудочно-кишечного тракта на основании изучения полиморфизма генов репарации XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751.

Решение такой задачи позволит использовать их при оценке индивидуальной предрасположенности к РЖ 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.

Материал и методы

В исследование были включены 143 больных раком желудка (средний возраст (61 ± 9) лет), в том числе 89 мужчин и 54 женщины, которые находились на диспансерном учете и стационарном лечении в ОГУЗ «Томский областной онкологический диспансер». Группу сравнения составил 251 практически здоровый человек с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Диагноз «рак желудка» основывался на данных анамнеза и результатах рентгенологического, эндоскопического и морфологического обследований.

Материалом для исследования полиморфизмов генов эксцизионной репарации XRCC1 280, XRCC1 194, XRCC1 399 и XPD 751 явилась ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови.

Лейкоциты получали в результате гомогенизации сгустка крови и многократной промывки автоклавируемой дистиллированной водой в стерильных условиях. Выделение ДНК из лейкоцитов крови проводили

методом осаждения 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 *XPД 751*. Типирование образцов проводили путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием четырех пар олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участку гена *XRCC1 Arg194Trp* (F: 5'-ggg-aag-ctg-tac-ctg-tca-ctc; R: 5'-gac-cca-gga-atc-tga-gcc), гена *XRCC1 Arg280His* (F: 5'tgg-ggc-ctg-gat-tgc-tgg-gtc-tg; R: 5'cag-cac-cac-tac-cac-acc-ctg-aag-g), гена *XRCC1 Arg399Gln* (F: 5'ttg-tgc-ttt-ctc-tgt-gtc-ca; R: 5'tcc-tcc-agc-ctt-tac-tgata) и гена *XPД Lys751Gln* (F: 5'tca-aac-atc-ctg-tcc-cta-ct; R: 5'ctg-ccg-att-aaa-ggc-tgt-gga) [4].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 for Windows. При сравнении частот генотипов в группах больных и здоровых лиц использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона; при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса и критерий Фишера. Подсчитывали отношение шансов (odds ratio (OR)) для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития заболевания по стандартной формуле $OR = (a/b)(d/c)$, где *a* и *b* — количество

больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип соответственно, *d* и *c* — количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип соответственно. OR указан с 95%-м доверительным интервалом (confidence interval (CI)) [7].

Результаты и обсуждение

При анализе частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *XRCC1 G280A* (Arg280His) у больных раком желудка и здоровых лиц были установлены тенденции к увеличению частот минорных генотипов (табл. 1). Среди больных РЖ носители вариантного АА-генотипа встречались в 2,1% случаев и не были выявлены в группе здоровых доноров (табл. 1). Также отмечено увеличение частоты встречаемости гетерозигот в группе здоровых лиц, что позволяет предполагать о существовании протективного действия GA-генотипа гена *XRCC1 G280A* в отношении развития рака желудка (табл. 1).

При изучении распределения генотипов и аллелей гена *XRCC1 G399A* (Arg399Gln) у больных раком желудка и здоровых доноров выявлена тенденция к увеличению частоты встречаемости функционально неполноценных генотипов GA (Arg/Gln) (38,5%) и AA (Gln/Gln) (9,8%) и аллеля А (29,0%) по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц (35,8; 8,8 и 26,7% соответственно) (табл. 1, 2).

Таблица 1

Распределение вариантных генотипов генов *XRCC1 280*, *XRCC1 399*, *XRCC1 194* и *XPД 751* у больных раком желудка и здоровых лиц

Ген	Генотип	Здоровые лица (251 человек)		Больные раком желудка (143 человека)		χ^2, p	OR (CI _{95%})
		Абс.	%	Абс.	%		
<i>XRCC1 280</i>	GG	228	90,8	129	90,2	$\chi^2 = 5,498$ $p = 0,064$	0,84 (0,39—1,67) 5,02 (0,46—126,63)
	GA	23	9,2	11	7,7		
	AA	0	0	3	2,1		
<i>XRCC1 399</i>	GG	139	55,4	74	51,8	$\chi^2 = 0,49$ $p = 0,781$	Не определяется
	GA	90	35,8	55	38,5		
	AA	22	8,8	14	9,8		
<i>XRCC1 194</i>	CC	230	92,0	114	79,4	$\chi^2 = 13,97$ $p = 0,001$	2,85 (1,59—6,88)
	CT	21	8,0	28	19,9		
	TT	0	0	1	0,7		
<i>XPД 751</i>	AA	216	86,1	83	58,0	$\chi^2 = 53,9$ $p = 0,000$	2,97 (1,67—7,41) 49,3 (6,73—104,95)
	AC	35	13,9	40	28,0		
	CC	0	0	20	14,0		

Примечание. Здесь и в табл. 2: 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.

Таблица 2

Распределение вариантных аллелей генов *XRCC1 280*, *XRCC1 399*, *XRCC1 194* и *XPД 751* у больных раком желудка и здоровых лиц

Ген	Аллель	Здоровые лица, (251 человек)		Больные раком желудка (143 человека)		χ^2, p	OR (CI _{95%})
		Абс.	%	Абс.	%		
<i>XRCC1 280</i>	G	479	95,4	269	94,1	$\chi^2 = 0,45$ $p = 0,503$	1,31 (0,65—2,62)
	A	23	4,6	17	5,9		
<i>XRCC1 399</i>	G	368	73,3	203	71	$\chi^2 = 0,39$ $p = 0,535$	1,12 (0,79—1,58)
	A	134	26,7	83	29,0		
<i>XRCC1 194</i>	C	481	95,9	256	89,4	$\chi^2 = 12,4$ $p = 0,000$	2,84 (1,59—6,88)
	T	21	4,1	30	10,6		
<i>XPД 751</i>	A	467	93,1	206	72,1	$\chi^2 = 62,8$ $p = 0,000$	5,18 (3,25—8,41)
	C	35	6,9	80	27,9		

При анализе полиморфных вариантов гена *XRCC1* C194T (Arg194Trp) у больных раком желудка установлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости гетерозигот СТ (Arg/Trp) и гомозигот ТТ (Trp/Trp) по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц. Частота встречаемости гетерозигот гена *XRCC1* C194T увеличена почти в 2,5 раза у больных раком желудка. Риск развития рака желудка для носителей минорных вариантных генотипов *XRCC1* C194T составил 2,85 (CI_{95%} 1,59—6,88) (табл. 1).

Также было выявлено увеличение частоты встречаемости полиморфного аллеля Т у больных раком желудка по сравнению с таковой у здоровых лиц (10,6 и 4,1% соответственно) (табл. 2). Риск развития рака желудка для носителей функционально неполноценного аллеля Т гена *XRCC1 194* составил 2,84 (CI_{95%} 1,59—6,88).

При исследовании полиморфизма гена эксцизионной репарации нуклеотидов *XPД A751C* (Lys751Gln) у больных раком желудка было выявлено статистически значимое увеличение частоты встречаемости вариантных генотипов СС (Gln/Gln) (14,0%) и АС (Lys/Gln) (27,9%) по сравнению с частотой соответствующих генотипов у здоровых лиц (0 и 13,9%) (см. табл. 1).

Риск развития рака желудка для здоровых носителей вариантного АС-генотипа гена *XPД 751* составил 2,97 (CI_{95%} 1,67—7,41), СС-генотипа — 49,3 (CI_{95%} 6,73—104,95).

Частота вариантного аллеля С гена *XPД A751C* у больных раком желудка в 4 раза превышала таковую у здоровых лиц (27,9 и 6,9% соответственно при

$p < 0,001$) (см. табл. 2). Присутствие в генотипе вариантного аллеля С увеличивает риск развития РЖ более чем в 5 раз (CI_{95%} 3,25—8,41).

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют сделать выводы о том, что полиморфные варианты генов эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований ДНК *XRCC1* C194T, G280A и *XPД A751C* статистически ассоциированы с развитием рака желудка. Выявленные отличия в распределении вариантных генотипов, кодирующих отдельные структурные единицы сложного комплекса, участвующего в эксцизионной репарации ДНК, могут свидетельствовать о высоком уровне взаимозависимости его компонентов. Согласно полученным данным, замена даже одного нуклеотида, фенотипически проявляющаяся в замене аминокислоты, приводит к изменению функций всего комплекса.

Результаты данного исследования могут быть положены в основу разработки молекулярно-генетических маркеров, направленных на выявление групп повышенного риска развития рака желудка, с целью дальнейшего проведения в них профилактических мероприятий.

Литература

1. Анисимов В.Н. Старение и канцерогенез: роль генетических и канцерогенных факторов // Тез. Рос. конф. по фундамент. 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). СПб.: Интермедика, 2000. 272 с.

3. *Имянитов Е.Н.* Эпидемиология и биология рака желудка // Практич. онкология. 2009. Т. 10, № 1. С. 1—7.
4. *Литвяков Н.В.* Взаимосвязь генного полиморфизма с риском развития злокачественных новообразований в условиях низкоинтенсивного радиационного воздействия // Эколог. генетика человека. 2009. Т. 7, № 4. С. 24—33.
5. *Мансурова Г.Н.* Хромосомные aberrации и полиморфизм генов эксцизионной репарации у работников СХК с онкологическими заболеваниями // Сиб. онколог. журн. 2008. Прил. 1. С. 84—85.
6. *Турусов В.С.* Химический канцерогенез // Канцерогенез / под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. С. 204—250.
7. *Флейс Д.* Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций / под ред. Д. Флейс. М.: Финансы и статистика. 1989. 319 с.
8. *Хансон К.П.* Молекулярная онкология: фундаментальные достижения и практические перспективы // Тез. Рос. конф. по фундамент. онкологии. М., 2005. С. 3—4.
9. *Benhamou S.* ERCC2/XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review // Am. J. Epidemiology. 2005. V. 161. P. 1—14.
10. *Brem R.* XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells // Nucleic Acids Research. 2005. V. 33. P. 2512—2520.
11. *Hou S.M.* The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk // Carcinogenesis. 2002. V. 23. P. 599—603.
12. *Pakakasama S.M.* Genetic polymorphisms and haplotypes of DNA repair genes in childhood acute lymphoblastic leukemia // Pediatric Blood and Cancer. 2007. V. 48 (1). P. 16—20.
13. *Scharer O.D.* Chemistry and biology of DNA repair // Angewandte Chemie International Edition. 2003. V. 42. P. 2946—2974.
14. *Wood R.D.* Human DNA repair genes // Science. 2001. V. 291. P. 1284—1289.
15. *Wu X.* Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes // Am. J. Human Genetics. 2006. V. 78. P. 464—479.

Поступила в редакцию 18.11.2010 г.

Утверждена к печати 13.05.2011 г.

Сведения об авторах

С.С. Ракитин — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

А.И. Дмитриева — д-р мед. наук, ассистент кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

И.А. Кузнецова — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

В.А. Авхименко — канд. мед. наук, зам. главного врача по медицинской части ОГУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (г. Томск).

Для корреспонденции

Ракитин Сергей Сергеевич, тел. 8-913-816-9557; e-mail: rakitinss@yandex.ru