

Роль полиморфизма генов эксцизионной репарации ДНК и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков в ранней диагностике рака желудка

А.П.КОШЕЛЬ, Н.В.СЕВОСТЬЯНОВА, С.С.КЛОКОВ, А.В.КАРПОВИЧ, А.И.ДМИТРИЕВА, С.А.РАКИТИН, С.И.МАРТОВ, Е.В.ЗАЛЕСНАЯ

Role of the gene polymorphism of DNA excision repair and xenobiotic biotransformation enzymes in early diagnosis of gastric cancer

A.P.KOSHEL, N.V.SEVOSTYANOVA, S.S.KLOKOV, A.V.KARPOVICH, A.I.DMITRIEVA, S.A.RAKITIN, S.I.MARTOV, E.V.ZALESNAYA

НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета

В последнее время широко проводятся исследования связи полиморфизма генов эксцизионной репарации ДНК и генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития злокачественных новообразований желудка. Проведено изучение соотношения патологических и нормальных генотипов генов эксцизионной репарации ДНК hOGG1, XPD1, XPG, XRCC1, XRCC2 и генов GSTT1, GSTM1 в комплексе ранней диагностики рака желудка. Полученные результаты 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 играют патогенетическую роль в становлении клинических признаков данного злокачественного процесса.

Ключевые слова: хирургическое лечение, рак желудка, репарация ДНК, ферменты биотрансформации ксенобиотиков

Recently studies of the correlation between gene polymorphism of DNA excision repair and xenobiotic biotransformation enzymes and risk of gastric malignancies appearance have been taken widely. We investigated the ratio of the pathologic and normal types of DNA excision repair genes hOGG1, XPD1, XPG, XRCC1, XRCC2 and GSTT1, GSTM1 genes as a mean for early gastric cancer diagnosis. Revealed results showed that the risk of gastric cancer is higher in pathologic genotypes CYP1A, GSTT1 and GSTM1 and DNA excision repair genes XRCC1 C194T, XPD1 A751. Besides their property of the risk factor for gastric cancer these pathologic alleles and genotypes of the studied genes play a pathogenic role in development of the clinical features of this malignant process.

Key words: surgical treatment, gastric cancer, DNA repair genes, xenobiotic biotransformation enzymes

Рак желудка (РЖ) является четвертой по частоте формой злокачественных новообразований и занимает второе место в структуре общей летальности от злокачественных новообразований. Такая высокая летальность объясняется поздним выявлением РЖ, когда основной метод радикального лечения этого заболевания, хирургический, является мало эффективным. Совершенно очевидно, что для решения проблемы ранней диагностики рака желудка необходимы надежные и простые методы детекции опухолевого процесса, которые позволяли бы выявлять опухоль на ранних или доклинических стадиях [3, 5].

Известно, что трансформация клеток в раковые и прогрессия онкологического процесса связаны с накоплением генетических и эпигенетических изменений в геноме [2, 8]. Апоптоз или его отдельные элементы выполняют важные физиологические функции, при этом преодоление апоптоза является необходимым условием успешного развития опухоли [9]. 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, XPD1, XPG, 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 [12].

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 канце-

рогенеза 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 мутагенных 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 метаболизируются и выведены из клетки. GST обладают также некоторой пероксидазной активностью, благодаря чему играют важную роль во внутриклеточном связывании и транспорте большого числа как эндогенных, так и экзогенных соединений [1, 7].

Цель исследования: изучение соотношения патологических и нормальных генотипов генов эксцизионной репарации ДНК hOGG1, XPD1, XPG, XRCC1, XRCC2 и генов GSTT1, GSTM1 в плане ранней диагностики рака желудка.

Материалы и методы

В работе было обследовано 90 пациентов со злокачественными новообразованиями желудка – они составили основную группу, в группу контроля вошли 231 практически здоровых жителей г. Томска. Пациенты находились на стационарном лечении в НИИ гастроэнтерологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (г. Северск). За период с 2008 по 2010 годы на базе НИИ гастроэнтерологии имени Г.К.Жерлова ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава оперативное лечение прошли 90 больных раком желудка, в том числе T1-3N0-2M0. Гастрэктомия была выполнена у 62 пациентов (68,8%), субтотальная дистальная резекция (СДР) желудка – у 28 больных (31%). Всем больным операции были выполнены по оригинальной методике Г.К.Жерлова с формированием арефлюксного механизма. Исследование выполняли с разрешения Комитета по этике Сибирского государственного медицинского университета (закключение №583 от 19.03.2007 г.). После оперативного лечения удаленные ткани забирались для гистологического исследования.

Злокачественные неоплазии были представлены, в основном, аденокарциномами различной степени дифференцировки (83,3%), перстневидноклеточным (7,4%) и недифференцированным раком (9,3%) желуд-

ка. При наличии показаний, хирургическое лечение дополнялось химиотерапией, либо лучевой терапией.

Выделение ДНК из образцов цельной крови проводили стандартным методом с использованием фенол-хлороформной очистки [11]. Обследованные индивиды были прогенотипированы по биаллельным полиморфизмам генов репарации ДНК (hOGG, XPD1, XPG, XRCC1). Для типирования данных генных маркеров использованы рестрикционный анализ продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) по методикам, описанным в литературе [13-16]. Образцы ДНК основной и контрольной групп 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'-ggt-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 MgCl₂, 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 сек., 65°C – 25 сек., 72°C – 20 сек.; четыре цикла: 94°C – 20 сек., 63°C – 25 сек., 72°C – 20 сек.; 25 циклов: 94°C – 20 сек., 61°C – 25 сек., 72°C – 20 сек. 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 +/-), результатом которой следует ожидать полноценное функционирование глутатион S-трансфераз. Поэтому группы +/+ и +/- для расчетов объединили в группу (+) и противопоставляли ей гомозигот 0/0. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена ER размером 181 п.н. [9].

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, XPD1, XPG, XRCC1, XRCC2), которые способны к репарации повреждений в ДНК, возникающих в результате внешних и внутренних 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.

Не было выявлено ассоциации аллелей и генотипов со злокачественными новообразованиями желудка для следующих полиморфизмов исследуе-

мых 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

Таблица 1

Распределение генотипов и аллелей генов эксцизионной репарации (hOGG1, XPD1, XPG, XRCC1, XRCC2) у больных раком желудка и здоровых лиц

Гистологические формы	Генотипы			Аллели		P ₂ , ош
	CC	CT	TT	С	Т	
Рак ЖКТ XRCC1 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			
XRCC1 G280A n=90	GG	GA	AA	G	A	P ₂ 0,2566 1,77 (0,71-4,56)
P ₁	0,3164	0,4331	0,8870			
XRCC1 A399G n=90	AA	AG	GG	A	G	p 0,4218 1,24 (0,77-1,99)
P ₁	0,9534	0,3727	0,3163			
XPD1 A751 n=90	AA	AC	CC	A	C	p 0,0260 (1,07-2,92)
P ₁	0,0508	0,3953	0,1780			
hOGG C326G n=90	CC	CG	GG	C	G	p 0,4333 1,36 (0,69-2,71)
P ₁	0,4760	0,6491	0,6974			
XPG G1104C n=90	GG	GC	CC	G	C	p 0,1927 1,55 (0,82-2,96)
P ₁	0,6284	0,7933	0,0719			

Примечание: P₁ – достоверность отличий для генотипов; P₂ – достоверность отличий для аллелей.

Таблица 2

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

Группы обследованных	Генотип			P ₁	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%})
GSTT1	+	189 (81,8%)	80 (88,9%)	X ² = 2,72 p=0,099	OR= 1,70 CI ₀ 1,01-2,85
	0/0	42(18,2%)	10(11,1%)		
GSTM1	+	138 (59,7%)	42 (46,7%)	X ² = 3,98 p= 0,046	
	0/0	93 (40,3%)	48 (53,3%)		

ксенобиотиков. Исследование Иле/Вал-полиморфизма гена первой фазы биотрансформации ксенобиотиков цитохрома P-450 CYP1A1 (замена аминокислоты изолейцина (Иле) на валин (Вал) в 462-кодоне молекулы цитохрома P-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 соответствующую 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 (O₉₅o/о 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 пред-

ставлены 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 M1 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 (CI₉₅o/о 1,01-2,85).

Заключение

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.

Список литературы

1. Баранов В.С., Баранова В.Е., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Генотип человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. СПб.: Интермедика 2000; 272.
2. Георгиев Г.П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей. Соросовский образовательный журнал (биология) 2000; 11: 17-22.

3. Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е. Рак легкого. М.: Медицина 1994; 187.
4. Дмитриева А.И., Новицкий В.В., Севостьянова Н.В. Изучение полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 у больных раком легких. Бюллетень СО РАМН 2004; 1: 60-62.
5. Долл Р., Пито Р. Причины рака. Киев: Наукова думка 1984; 254.
6. Заридзе Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных новообразований. Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Научный мир. 2000; 21 – 25.
7. Иващенко Т.Э., Швед Н.Ю., Крамарева Н.А. Анализ полиморфных аллелей генов, кодирующих ферменты 1-й и 2-й фазы детоксикации, у больных эндометриозом. Генетика 2003; 39: 4: 525 – 529.
8. Имянитов Е.Н., Калиновский В.П., Князев П.Г. Молекулярная генетика опухолей человека. Вопросы онкологии 1997; 43: 2: 95 - 101.
9. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гришианова А.Ю. Геномная медицина и новые подходы к диагностике и лечению онкозаболеваний. Бюллетень СО РАМН 2004; 2(112): 20-26.
10. Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций. М.: Финансы и статистика 1989; 319.
11. Чердынцева Н.В., Севостьянова Н.В., Уразова Л.Н. К вопросу о генетических и эпигенетических факторах риска рака легкого. Молекулярная медицина 2005; 3: 49-54.
12. Benhamou S., Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. Mutat. Res. 2000; 462: 149-158.
13. Marchand L. Le, Donlon T., Lum-Jones A. et al. Association of the hOGG1 Ser326Cys Polymorphism with Lung Cancer Risk1. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2002; 11: 409-412.
14. Novoradovsky A., Brantly M.L., Waclawiw M.A. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in α 1-antitrypsin deficiency. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1999; 20(3): 441-447.
15. Sanyal S., Festa F., Sakano S. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. Carcinogenesis 2004; 25: 729-734.
16. Wilkinson R.J., Patel P., Llewelyn M. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 β on tuberculosis. J. Exp. Med. 1999; 189: 1863-1873.

Поступила 17.07.10 г.

Информация об авторах

1. Кошель Андрей Петрович – доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru
2. Севостьянова Наталия Владимировна – доктор медицинских наук, профессор заместитель директора по научной работе НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru
3. Клоков Сергей Сергеевич – кандидат медицинских наук, заместитель директора по клинической работе НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru
4. Карпович Александр Викторович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru
5. Дмитриева Алла Ивановна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru
6. Ракитин Сергей Сергеевич - аспирант НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru
7. Мартов Сергей Иванович – аспирант НИИ гастроэнтерологии им. Г.К.Жерлова Сибирского государственного медицинского университета; e-mail: sev_nv@mail.ru