

В.И. Минина ¹, М.Л. Баканова ¹, Я.А. Савченко ¹, А.А. Тимофеева ¹, Т.П. Аносова ¹, В.А. Титов ²,
Н.Е. Вергбизкая ³, А.Н. Глушков ¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ ДНК И ЧАСТОТОЙ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

¹ Институт экологии человека СО РАМН (Кемерово)

² Областной клинический онкологический диспансер (Кемерово)

³ Кемеровское патологоанатомическое бюро (Кемерово)

Проводили поиск ассоциаций между рядом полиморфизмов в генах репарации ДНК и уровнем хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови в двух группах: 215 больных раком легкого и 152 здоровых доноров. В группе больных РЛ уровень хромосомных aberrаций был статистически значимо выше у носителей генотипов TG и GG гена XPD, по сравнению с генотипом TT. В контрольной группе здоровых доноров уровень ХА был выше у носителей генотипа TC гена ADPRT, по сравнению с генотипом TT.

Ключевые слова: рак легкого, хромосомные aberrации, гены ферментов репарации ДНК

ASSOCIATION OF DNA REPAIR GENE POLYMORPHISM WITH CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN THE BLOOD LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH LUNG CANCER

V.I. Minina ¹, M.L. Bakanova ¹, J.A. Savchenko ¹, A.A. Timopheeva ¹, T.P. Anosova ¹,
V.A. Titov ², N.E. Verghbizkaja ³, A.N. Glushkov ¹

¹ Institute of Human Ecology SB RAMS, Kemerovo

² Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo

³ Pathologoanatomic bureau, Kemerovo

Analysis of association between several DNA repair gene polymorphisms and the level of chromosomal aberrations (CAs) in lymphocytes was performed in two groups: a group of 215 patients with lung cancer and a control group of 152 donors. In the group patient with lung cancer the level of CAs shows a significant increase in the carrier of genotypes: XPD TG and XPD GG vs XPD TT. In the control group level of CAs shows a significant increase in the carrier of genotype ADPRT TC vs TT.

Key words: lung cancer, chromosomal aberrations, DNA repair gene

Рак легкого (РЛ) занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности среди мужского населения России. Известно, что риск РЛ существенно возрастает у курящих лиц, особенно в условиях загрязнения вдыхаемого атмосферного воздуха продуктами термической обработки угля, древесной и металлической пылью. Ввиду высокой концентрации предприятий угледобывающего и перерабатывающего комплекса на территории Кемеровской области особую актуальность представляют исследования больных РЛ, проживающих в этом регионе.

Признанным маркером мутагенного воздействия среды на организм являются хромосомные aberrации (ХА) в лимфоцитах крови, однако остается много неясного относительно специфики их формирования у больных злокачественными опухолями.

Известно, что тонкие изменения специфических белков, функционирующих в репаративных системах, потенциально способны приводить к мутагенезу [11]. Интенсивно изучаются ассоциации уровня повреждений ДНК и полиморфизмов генов ферментов репарации: XRCC1, XPD/ERCC2, hOGG1, APE1, ADPRT. Понимание роли генетических повреждений и их репарации в механизме возникновения РЛ сегодня являются основной предпосылкой для разработки новых терапевтических технологий и диагностических критериев в

оценке функционирования молекулярных звеньев этиологической цепочки процесса инициации данного онкологического заболевания.

В связи с этим **целью** данного исследования стало изучение связи ХА с полиморфизмом генов репарации ДНК у жителей Кемеровской области больных РЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было обследовано 367 человек. Из них 215 больных РЛ, проживающих на территории Кемеровской области, поступивших на лечение в Кемеровский областной онкологический диспансер. В группу вошло 180 мужчин и 37 женщин. Среди обследованных соотношение курящие/некурящие составило 181/37. Средний возраст — 58 лет. Группу сравнения составили 152 здоровых донора (56 мужчин и 96 женщин; средний возраст — 44 года; курящих и некурящих — 40/115), также проживающих в Кемеровской области.

Материалом для исследования послужила цельная периферическая кровь. Культивирование клеток крови осуществляли по стандартному полумикрометоду [7]. Питательную смесь готовили из расчета: среда RPMI — 1640 (6 мл), сыворотка крупного рогатого скота (1,5 мл) и 0,1 мл фитогемагглютина (ПанЭко). Смесь помещали в стерильные культуральные флаконы и добавляли 0,5 мл гепа-

ринизированной крови. Культуральные флаконы выдерживали при 37 °С в течение 48 часов. За 2 часа до фиксации в культуры вводили колхицин (0,5 мкг/мл). После гипотонической обработки и фиксации клеток суспензию раскапывали на охлажденные чистые предметные стекла и высушивали над пламенем спиртовки. Препараты окрашивали 1% красителем Гимза и анализировали под микроскопом Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Germany). Для учета ХА у каждого индивида проанализировано от 100 до 200 метафаз. Регистрировали aberrации хромосомного и хроматидного типов в соответствии с общепринятыми требованиями [2]. Долю aberrантных метафаз определяли путем подсчета частоты метафаз с aberrациями хромосом (в процентах от изученного числа клеток).

Для изучения полиморфизмов генов репарации ДНК: *APE1 Asp148Glu*; *hOGG1 Ser326Cys*; *XPB Lys751Gln*; *ADPRT Val762Ala* использовали коммерческую тест-систему «SNP-express» (НПФ «Литех», г. Москва). ПЦР проводили на амплификаторах ТЕРЦИК (НПФ «ДНК-Технология», Россия) по программе, рекомендованной производителем набора. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в горизонтальном 3% агарозном геле. После окончания электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для основных показателей рассчитывали средние значения и их стандартные ошибки ($M \pm m$). Распределение значений всех изученных показателей сравнивалось с нормальным методом Колмогорова-Смирнова. По результатам анализа установлено, что распределение всех изучаемых цитогенетических параметров отличалось от нормального. На основании этого, в дальнейшем, для сравнения групп использовали ранговый U-тест Манна – Уитни. Сравнение частот генотипов проводили с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации (χ^2). Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования было зафиксировано, что средняя частота aberrантных метафаз у больных РЛ составила $2,88 \pm 0,13$ %, что статистически значимо выше, чем в группе здоровых — $1,79 \pm 0,13$ % ($U_{M-W} = 21253$; $p = 0,00001$). Увеличение частоты aberrаций хромосом в группе больных РЛ достигается, преимущественно, за счет одиночных фрагментов.

Сопоставление цитогенетических параметров между мужчинами и женщинами не выявило никаких различий между полами, как в опытной, так и в контрольной группе. Наблюдаемые различия частоты ХА между РЛ и контролем достигали статистической значимости как у мужчин ($p = 0,000004$), так и у женщин ($p = 0,02$).

Анализ воздействия фактора курения не показал значимых отличий ХА между группами курящих и некурящих в изученных выборках больных РЛ и здоровых доноров.

На следующем этапе проводился анализ полиморфизмов генов репарации ДНК в изучаемых группах. Учитывая тот факт, что средний возраст в группе здоровых доноров был ниже (43 года), чем в группе больных РЛ (58 лет), первоначально проводилась проверка влияния возраста на частоты генотипов. Группы были разделены на подгруппы: до 50 лет и старше 50 лет. Сопоставление частот генотипов всех изученных генов в данных подгруппах показала отсутствие статистически значимых отличий. Исходя из этого, в дальнейшем мы проводили сравнение групп больных РЛ и здоровых доноров без подразделения их на возрастные подгруппы.

Проведенный анализ позволил выявить значимую положительную ассоциацию генотипа *hOGG1 GG* с РЛ (8,9 % в исследуемой группе против 1,3 % в группе сравнения; $\chi^2 = 4,23$; $p = 0,04$; $RR = 5,99$; $CI = 2,25 - 15,97$). Для генотипа *CC* гена *hOGG1* выявлена значимая отрицательная ассоциация с РЛ (66,3 % в группе сравнения против 46,1 % в исследуемой группе; $\chi^2 = 7,07$; $p = 0,008$; $RR = 0,44$; $CI = 0,17 - 1,17$).

Ген *hOGG1* кодирует фермент ДНК-гликозилазу, которая вырезает мутантное основание 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-OHdG), возникающее в результате воздействия на ДНК свободных радикалов. Для аллеля *hOGG1 326Cys* установлена сниженная функциональная активность кодируемого им фермента [6], что приводит к снижению индивидуальной способности к репарации повреждений ДНК и повышению чувствительности к канцерогенам [12].

На следующем этапе был проведен анализ частоты ХА в зависимости от различных генотипов генов системы репарации ДНК. Результаты представлены в таблицах 1 и 2. В группе здоровых доноров (табл. 1) показатели хромосомного мутагенеза: доля aberrантных метафаз, доля aberrаций на 100 клеток, aberrаций хромосомного типа были статистически значимо выше у носителей генотипа *TC* гена *ADPRT*, по сравнению с генотипом *TT*. Повышения уровня ХА у носителей различных комбинаций генотипов изученных генов выявлено не было.

Ген *ADPRT* (adenosine diphosphate ribosyl transferase) кодирует ассоциированный с хроматином фермент поли-АДФ-рибозил-полимеразу (PARP), которая модифицирует различные ядерные белки. PARP относится к одному из ядерных факторов, первым распознающим повреждение ДНК, входит в мультипротеиновый комплекс (MP-комплекс), включающий, кроме него, еще фактор XRCC1, ДНК-лигазу III и бета-ДНК-полимеразу. PARP способен регулировать активность MP-комплекса путем модифицирования белков. Кроме того, PARP служит источником энергии для ДНК-лигаз, описано участие PARP в процессах репликации, транскрипции, модификации хроматина и апоптоза [8]. Трансверсия Т-С в сайте 2285 локализована в каталитическом домене белка и сопровождается потерей метильной

Таблица 1

Характеристика основных цитогенетических показателей у здоровых доноров из группы сравнения с различными генотипами системы репарации ДНК

Полиморфизм	Генотип	n	Доля aberrантных метафаз, %	Аберраций на 100 клеток, %	Аберраций хроматидного типа, %	Аберраций хромосомного типа, %
APE(X)1 T444G	TT	53	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	TG	57	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	1,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1
	GG	29	1,9 ± 0,4	1,6 ± 0,4	1,8 ± 0,4	0,1 ± 0,07
hOGG1 C977G	CC	91	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	CG	59	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1
	GG	2	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,9	0
ADPRT T2285C	TT	65	1,3 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	1,1 ± 0,2*	0,3 ± 0,1
	TC	44	2,8 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,3 ± 0,4	0,5 ± 0,1
	CC	8	2,5 ± 0,9	2,4 ± 0,7	2,1 ± 0,7	0,3 ± 0,2
XPD T2251G	TT	49	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	TG	65	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1
	GG	22	2,3 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,4	0,3 ± 0,1

Примечание: * – отличается от ADPRT TC, $p = 0,002$.

группы, в результате чего может нарушаться связь одной из петель белка с активным центром фермента, что в свою очередь может являться причиной снижения функциональной активности белка [5]. Замена Val762Ala связывается с повышенной предрасположенностью к развитию некоторых форм рака [9]. В работе Zhang (2005) было обнаружено небольшое повышение риска рака для замены ADPRT Val762Ala и 5-кратное возрастание риска для сочетания ADPRT 762AlaAla XRCC1 399GlnGln [15]. Кроме того, было показано повышение частоты ХА в клетках крови детей с генотипами ADPRT AlaAla, ADPRT ValAla, по сравнению с ADPRT ValVal, проживающих в условиях воздействия повышенных доз

радоны [3]. В данном же исследовании, впервые была показана значимость генотипа ADPRT в формировании хромосомных нарушений у взрослых здоровых доноров в условиях спонтанного мутагенеза.

В группе больных РЛ (табл. 2) уровень хромосомных аберраций (показатели: доля aberrантных метафаз, доля аберраций на 100 клеток, аберраций хромосомного типа) был статистически значимо выше у носителей генотипов TG и GG гена XPD, по сравнению с генотипом TT.

Ген XpD/ERCC2 (excision repair crosscomplementing rodent repair deficiency, complementation group 2 [xeroderma pigmentosum D]) локализован на хромосоме 19q32.2 и кодирует АТФ-независимую

Таблица 2

Характеристика основных цитогенетических показателей у больных раком легкого с различными генотипами системы репарации ДНК

Полиморфизм	Генотип	n	Доля aberrантных метафаз, %	Аберраций на 100 клеток, %	Аберраций хроматидного типа, %	Аберраций хромосомного типа, %
APE(X)1 T444G	TT	52	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,4	2,8 ± 0,3	0,6 ± 0,1
	TG	65	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	GG	49	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3	2,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1
hOGG1 C977G	CC	99	2,9 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	CG	75	3,5 ± 0,3	3,4 ± 0,3	2,9 ± 0,3	0,5 ± 0,1
	GG	17	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,4	1,9 ± 0,4	0,4 ± 0,2
ADPRT T2285C	TT	127	3,2 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1
	TC	75	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3	2,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1
	CC	15	2,7 ± 0,6	2,6 ± 0,6	2,4 ± 0,5	0,3 ± 0,1
XPD T2251G	TT	45	2,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*	2,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1*
	TG	80	3,3 ± 0,3	3,2 ± 0,3	2,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1**
	GG	44	3,5 ± 0,3	3,6 ± 0,3	2,8 ± 0,3	0,8 ± 0,1

Примечание: * – отличается от XPD TG и XPD GG, $p = 0,01$; ** – отличается от GG, $p = 0,04$.

хеликазы. Это ключевой белок эксцизионной репарации нуклеотидов, который узнает и исправляет различные мутации (сшивки оснований — тиминные димеры, аддукты ДНК, окислительные повреждения ДНК и др.), образующиеся, например, после УФ-облучения или окислительного стресса. В составе TFIIH транскрипционного комплекса хеликаза XpD раскручивает цепь ДНК, обеспечивая доступ эндонуклеаз к поврежденному участку. Полиморфизм T2251G, приводящий к замене Lys-751Gln меняет конфигурацию белка и может влиять на его взаимодействие с хеликазным активатором p44, приводя к уменьшению репаративной способности и повышению риска онкозаболеваний [4].

В ряде исследований было показано значение данной нуклеотидной замены при оценке частоты цитогенетических нарушений. Обнаружено возрастание общей частоты aberrаций в лимфоцитах крови у носителей аллеля *XpD 751Gln* после облучения [13] и при воздействии комплекса токсикантов шинного завода [10].

Таким образом, в результате проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- частота хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови у больных РЛ выше, чем у здоровых доноров;
- установлено, что у обладателей генотипа *hOGG1 GG* в 5,9 раз выше риск РЛ, по сравнению с носителями других вариантов генотипов (CC, CG).
- в группе больных РЛ уровень ХА был статистически значимо выше у носителей генотипов TG и GG гена *XPB*, по сравнению с генотипом TT.
- в контрольной группе здоровых доноров уровень ХА был выше у носителей генотипов TC гена *ADPRT*, по сравнению с генотипом TT.

ЛИТЕРАТУРА

1. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. — М.: Наука. — 1991. — 272 с.
2. Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. — М.: Медицины, 1982. — 263 с.
3. Минина В.И., Дружинин В.Г., Лунина А.А., Ларионов А.В. и др. Исследование взаимосвязи между полиморфизмом генов репарации ДНК и частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови человека // Эколог. генетика. — 2011. — Т. IX, № 2. — С. 74—79.
4. Benhamou S., Sarasin A. ERCC2/XPB polymorphisms and lung cancer // *Am J Epidemiol.* — 2005. — Vol. 161. — P. 1—14.
5. Cottet F., Blanche H., Verasdonck P. New polymorphisms in the human poly (ADP-ribose) polymerase-1 coding sequence: lack of association with longevity or with increased cellular poly (ADP-ribosyl)ation capacity // *J. Mol. Med.* — 2000. — Vol. 78. — P. 471—480.
6. Dherin C., Radicella J.P., Dizdaroglu M. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human *hOGG1* protein and the polymorphic *hOGG1* (Ser326Cys) protein which is frequently found in human population // *Nucleic Acids Research.* — 1999. — Vol. 27. — N 20. — P. 4001—4007.
7. Hungerford P.A. Leukocytes cultured from small inocula of wholeblood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl // *Stain Techn.* — 1965. — Vol. 40. — P. 333—338.
8. Godon C., Cordelieres F.P., Biard D. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — Vol. 36. — P. 4454—4464.
9. Lockett K., Hall M.C., Xu J. The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function // *Cancer Research.* — 2004. — Vol. 64. — P. 6344—6348.
10. Musak L., Soucek P., Vodickova L. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes // *Mutat Res.* — 2008. — Vol. 641, N 1—2. — P. 36—42.
11. Nemec A., Wallace S., Sweasy J. Variant base excision repair proteins: Contributors to genomic instability // *Seminars in Cancer Biology.* — 2010. — Vol. 20. — P. 320—328.
12. Park J., Chen L., Tockman M.S. The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (*hOGG1*) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk // *Pharmacogenetics.* — 2004. — Vol. 14, N 2. — P. 103—112.
13. Parshad R., Tarone R.E., Price F.M. Cytogenetic evidence for differences in DNA incision activity in xeroderma pigmentosum group A, C and D cells after X-irradiation during G2 phase // *Mutat. Res.* — 1993. — Vol. 294. — P. 149—155.
14. Weiss J.M., Goode E.L., Ladiges W.C. Polymorphic variation in *hOGG1* and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature // *Mol. Carcinog.* — 2005. — Vol. 42. — P. 127—141.
15. Zhang X., Miao X., Liang G. Polymorphisms in DNA Base Excision Repair Genes ADPRT and XRCC1 and Risk of Lung Cancer // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65, N 3. — P. 722—726.

Сведения об авторах

Минина Варвара Ивановна — руководитель группы цитогенетики ИЭЧ СО РАМН, доцент, кандидат биологических наук (660002, г. Кемерово, пр. Шахтеров, 72а, кв. 2; тел.: 8-923-616-45-52; e-mail: vminina@mail.ru)

Баканова Марина Леонидовна — младший научный сотрудник ИЭЧ СО РАМН (650000, г. Кемерово, пр. Октябрьский, 42-240)

Савченко Яна Александровна — младший научный сотрудник ИЭЧ СО РАМН (650056, г. Кемерово, ул. Волгоградская 29, кв. 30)

Тимофеева Анна Александровна — инженер-технолог ИЭЧ СО РАМН (650065, г. Кемерово, Ленинградский, 10)

Аносова Татьяна Петровна — научный сотрудник ИЭЧ СО РАМН (650000, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35)

Титов Виктор Александрович — заведующий торакальным отделением ФГБУЗ КО Областного клинического онкологического диспансера (650052, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35)

Вержбицкая Наталья Евгеньевна — заведующая патологоанатомическим отделением в ГБУЗ КО ОТ Кемеровском патологоанатомическом бюро (650052, г. Кемерово, ул. Волгоградская, 35)

Глушков Андрей Николаевич — директор ИЭЧ СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор (650065, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10; тел.: (3842) 57-50-79)