

А.И. Дмитриева^{1,2}, В.А. Серебрякова^{1,2}, И.А. Кузнецова¹, С.С. Ракитин^{1,2},
Л.А. Кудяков², В.В. Новицкий^{1,3}, К.И. Янкович¹

Исследование полиморфизмов гена *XPB A751C* у больных раком легкого с разными клинико-морфологическими характеристиками опухоли

¹Сибирский государственный медицинский университет,

²ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»,

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Изучено распределение полиморфных вариантов гена репарации ДНК *XPB A751C* при раке легкого в зависимости от гистологического типа опухоли (мелкоклеточный/ немелкоклеточный рак легкого) и распространенности опухолевого процесса (с очагами/ без очагов метастазирования). Установлено значимое увеличение частоты встречаемости минорного аллеля С, генотипов СС и АС полиморфного участка *A751C* гена *XPB* в группе больных раком легкого. Рассчитаны относительные риски развития рака легкого при носительстве полиморфных вариантов гена *XPB A751C*. Гетерозиготный генотип АС полиморфизма *A751C* гена *XPB* характеризуется наибольшим риском развития опухоли легкого с мелкоклеточным гистологическим типом. Гомозиготный генотип СС полиморфного участка *A751C* гена *XPB* ассоциирован с развитием опухоли легкого немелкоклеточного типа. Статистически значимых различий в распределении полиморфных вариантов гена *XPB A751C* в зависимости от распространенности опухолевого процесса получено не было.

Ключевые слова: *XPB A751C*, полиморфизм, рак легкого

Лидирующая позиция рака легкого в структуре причин смертности от онкологических заболеваний определяет проблему его ранней диагностики и повышения эффективности химиотерапии как одну из наиболее актуальных для современной онкологии [6,9,11]. Рак легкого является самой распространенной формой опухоли у мужчин (1-место) [9,14] и женщин (2-место) [9]. В качестве основных факторов риска рака легких рассматриваются курение, загрязнение воздушной среды канцерогенными веществами и генетическая предрасположенность [6,11].

Одной из систем, обеспечивающих поддержание целостности генома в условиях регулярного повреждающего действия эндогенных и экзогенных мутагенов, является система репарации ДНК [2,6]. Белок, кодируемый геном *XPB*

(xeroderma pigmentosum group D, хромосомный локус 19q13.3), является необходимым участником эксцизионной репарации нуклеотидов, обеспечивающей своевременное удаление из цепей ДНК генетических аддуктов, блокирующих последующую транскрипцию и репликацию ДНК [2,7,9,16,18]. Полиморфизм *A751C* в экзоне 23 кодирует аминокислотную замену Lys на Gln в домене связывания активатора хеликазной активности *XPB*. Конформационное состояние этого участка влияет на стабильность белкового комплекса, ответственного за процесс репарации [2,4,7,9,10,17].

Результаты работ, посвященных поиску ассоциации полиморфных вариантов гена *XPB* с развитием злокачественных новообразований, не однозначны. Так, показано увеличение риска развития рака пищевода [5] и рака желудка [15] при носительстве генотипа СС полиморфизма *A751C* гена *XPB*. При исследовании ассоциации полиморфных вариантов гена *XPB A751C* с риском развития рака молочной железы [3, 4] и колоректальным раком [18] достоверной связи найти не удалось. Другими группами [12,16], напротив, зарегистрировано значимое повышение риска рака молочной железы для носителей гомозиготного генотипа СС полиморфизма *A751C* гена *XPB*. Ряд источников [10,17,19] указывает на положительную ассоциацию развития рака легкого с аллелем С и генотипом СС гена *XPB A751C*. Вместе с тем, для жителей Азии и афро-американцев не было показано значимой корреляции между полиморфизмом *XPB A751C* и риском развития рака легких [11], а для населения Китая продемонстрировано снижение риска данной онкопатологии при носительстве аллеля С [13].

Таким образом, представленные исследования указывают на существенное значение полиморфизмов *XPB A751C* в развитии онкологических заболеваний разнообразной локализации. Противоречивость результатов рассмотренных работ, очевидно, обусловлена различиями в распределении полиморфных вариантов гена *XPB A751C* в соответствующих этнических группах.

Немалый интерес представляет изучение взаимосвязи полиморфных вариантов гена *XPDA751C* с особенностями клинико-морфологического проявления рака легкого, что позволит оценить индивидуальную предрасположенность к заболеванию с целью своевременной профилактики, выбора тактики терапии и прогнозирования отдаленных результатов лечения.

Цель исследования – изучить распределение полиморфных вариантов гена репарации ДНК *XPDA751C* при раке легкого в зависимости от гистологического типа опухоли и распространенности опухолевого процесса.

Материалы и методы

Работа проведена на образцах операционного материала (гистологически верифицированные участки опухолевой ткани) 93 пациентов (84 мужчины и 9 женщин, средний возраст $56,3 \pm 9,6$ года) с диагнозом рака легкого. Группу сравнения составили 230 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту, без онкологической патологии, хронических воспалительных процессов, аутоиммунных, наследственных и психических заболеваний. В исследование были включены индивидуумы только европейского происхождения. Исследование проводили в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан (Указ Президента РФ от 24.12.93 г. № 2288) под контролем этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Для оценки распределения полиморфных вариантов гена *XPDA751C* в зависимости от распространенности опухолевого процесса все больные раком легкого были разделены на две группы в зависимости от наличия или отсутствия очагов метастазирования в соответствии с классификацией злокачественных новообразований по системе TNM (1997 г.). Первую группу ($n=33$) составили пациенты без очагов метастазирования (T1-4N0M0), вторую группу ($n=60$) – пациенты с метастатическими поражениями регионарных лимфатических узлов (T1-4N0-2M0-1). Группу больных раком легкого без метастазов составили пациенты со II (21,3%) и III (57,8%) стадиями злокачественного процесса. Больные с метастазами имели в основном III (51,6%) и IV (37,9%) стадии заболевания.

В соответствии с результатами гистологического исследования операционного материала (выполненного в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ “ТООД”) больные были разделены на две группы: с мелкоклеточным ($n=22$) и немелкоклеточным раком легкого ($n=71$). Группу пациентов с немелкоклеточным раком легкого составили больные с плоскоклеточным раком, аденокарциномой и крупноклеточной карциномой.

Выделение геномной ДНК из операционного материала проводили с использованием коммерческого набора “FF-

PET DNA kit” (Qiagen, Германия) после предварительной депарафинизации образцов.

Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови выполняли с использованием стандартного метода осаждения ДНК на сорбенте (набор “ДНК-сорб-АМ”, ФГУН “ЦНИИЭ” Роспотребнадзора, Москва). Лейкоциты получали в результате гомогенизации сгустка крови и многократной промывки автоклавируемой дистиллированной водой в стерильных условиях.

Образцы ДНК больных раком легкого и здоровых доноров были протипированы по полиморфизму гена *XPDA751C* путем полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием пары олигонуклеотидных праймеров и зондов [1,8].

Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса; при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий Фишера. Для оценки ассоциации между определенными генотипами и риском развития заболевания производили подсчет отношения шансов (OR, указан с 95%-ным доверительным интервалом (CI)).

Результаты и обсуждение

Распределение полиморфных вариантов гена XPDA751C у больных раком легкого

Проведенное исследование показало, что у больных раком легкого минорный аллель С полиморфного участка *A751C* гена *XPDA751C* встречается в 38,17%, что достоверно выше, чем у здоровых лиц (16,30%). Риск развития рака легкого для здоровых носителей аллеля С составил 3,17 ($CI_{95\%}$ 2,16 – 4,66) (табл. 1).

Частота встречаемости генотипов АС и СС у больных раком легкого (44,09% и 16,13%, соответственно) превышала аналогичные показатели у здоровых доноров (24,78% и 3,91% соответственно). Обращало на себя внимание, что для здоровых носителей АС-генотипа риск развития рака легкого составил 2,39 ($CI_{95\%}$ 1,44 – 3,97), а для носителей СС-генотипа 4,72 ($CI_{95\%}$ 1,99 – 11,22) (табл. 1).

Распределение полиморфных вариантов гена XPDA751C у больных раком легкого в зависимости от распространенности опухолевого процесса

Анализ распределения генотипов и частоты аллелей полиморфного участка *A751C* гена *XPDA751C*

Таблица 1
Распределение генотипов и аллелей гена *XPDA2251C* (в абс. знач. и в %) у больных раком легкого и у здоровых лиц

Группы обследованных	Генотипы			p_1	Аллели		p_2
	АА	АС	СС		А	С	
Больные раком легкого, $n=93$	37 (39,78%)	41 (44,09%)	15 (16,13%)	0,000 $\chi^2=32,006$	115 (61,83%)	71 (38,17%)	0,000 $\chi^2=34,967$
Здоровые доноры, $n=230$	164 (71,30%)	57 (24,78%)	9 (3,91%)		385 (83,70%)	73 (16,30%)	

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных раком легкого и здоровыми донорами, p_2 – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных раком легкого и здоровыми донорами, χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частоты генотипов и аллелей генов.

Таблица 2
Распределение полиморфных вариантов гена *XPB A2251C* (в абс. знач. и в %) у больных раком легкого с метастазами и без таковых

Больные раком легкого	Генотипы			p_1	Аллели		p_2
	AA	AC	CC		A	C	
Без метастазов, n=33	15 (45,45%)	10 (30,30%)	8 (24,24%)	0,095 $\chi^2=4,705$	40 (60,61%)	26 (39,39%)	0,923 $\chi^2=0,009$
С метастазами, n=60	22 (36,67%)	31 (51,67%)	7 (11,67%)		75 (62,50%)	45 (37,50%)	

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий частоты генотипов между группами больных раком легкого с метастазами и без таковых, p_2 – уровень статистической значимости различий частоты аллелей между группами больных раком легкого с метастазами и без таковых, χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частоты вариантных генотипов и аллелей генов.

Таблица 3
Частота встречаемости генотипов и аллелей гена *XPB A2251C* (в абс. знач. и в %) у больных раком легкого с разными гистологическими типами опухоли

Группы сравнения	Генотипы			p_1	Аллели		p_2
	AA	AC	CC		A	C	
Здоровые доноры, n=230	164 (71,30%)	57 (24,78%)	9 (3,91%)	0,000	385 (83,70%)	75 (16,30%)	0,000 $\chi^2=20,444$
Больные раком легкого (мелкоклеточный тип), n=22	3 (13,64%)	18 (81,82%)	1 (4,55%)		24 (54,55%)	21 (45,45%)	
Больные раком легкого (немелкоклеточный тип), n=71	34 (47,89%)	23 (32,39%)	14 (19,72%)	0,000 $\chi^2=23,441$ $p^*=0,000$	91 (64,08%)	51 (35,92%)	0,000 $\chi^2=24,045$ $p^*=0,337$ $\chi^2=0,922$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий частот генотипов между группами больных раком легкого с различными гистологическими типами опухоли и здоровыми донорами, p_2 – уровень статистической значимости различий частот аллелей между группами больных раком легкого с различными гистологическими типами опухоли и здоровыми донорами, p^* – уровень статистической значимости различий частот встречаемости генотипов и аллелей между группами больных немелкоклеточным и мелкоклеточным гистотипами рака легкого, χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов между группами больных раком легкого и здоровыми донорами, χ^2 – стандартный критерий Пирсона для сравнения частот генотипов и аллелей генов между группами больных немелкоклеточным и мелкоклеточным гистологическими типами рака легкого.

у больных раком легкого с метастазами и без таковых не позволил установить статистически значимых отличий между исследуемыми показателями (табл. 2).

*Распределение полиморфных вариантов гена *XPB A751C* у больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли*

Существуют два основных гистологических типа рака легкого: немелкоклеточный рак легкого, который представлен плоскоклеточным раком, аденокарциномой и крупно-клеточной карциномой, и мелкоклеточный рак легкого [9,14].

Сравнительное генотипирование больных раком легкого в зависимости от гистологического типа опухоли позволило установить увеличение частоты встречаемости аллеля С у больных с мелкоклеточным раком легкого по сравнению с таковой у здоровых доноров (45,45% и 16,30%, соответственно) (табл. 3). Риск развития мелкоклеточного рака легкого для здоровых носителей минорного аллеля С возрастает в среднем в 4,28 раза ($CI_{95\%}$ 2,25 – 8,14).

Проведенное исследование показало, что у больных с мелкоклеточным и немелкоклеточным раком легкого отмечалось увеличение частоты встречаемости AC- и CC-генотипов полиморфного участка *A751C* гена *XPB* по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров. Обращало на себя внимание значительное,

в среднем в 13,66 раз ($CI_{95\%}$ 4,44 – 42,03), увеличение риска развития рака легкого с мелкоклеточным гистотипом при носительстве генотипа AC. Риск развития мелкоклеточного рака легкого у здоровых лиц с CC-генотипом полиморфного участка *A751C* гена *XPB* возрастает в 1,17 раза ($CI_{95\%}$ 0,14 – 9,68).

Наличие генотипов AC и CC полиморфного участка *A751C* гена *XPB* у здоровых лиц увеличивает риск развития немелкоклеточного типа рака легкого в 1,45 ($CI_{95\%}$ 0,81 – 2,60) и 6,03 ($CI_{95\%}$ 2,49 – 14,64) раз, соответственно. Риск развития злокачественного новообразования легких с данным гистологическим типом у здоровых носителей аллеля С увеличивается в 2,88 раза.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что полиморфные варианты гена эксцизионной репарации нуклеотидов и оснований ДНК *XPB A751C* статистически достоверно ассоциированы с развитием рака легкого. На основании полученных результатов можно констатировать, что высокий риск развития опухоли легкого положительно ассоциирован с носительством аллеля С, генотипов CC и AC полиморфного участка *A751C* гена *XPB*. Гетерозиготный генотип AC полиморфизма *A751C* гена *XPB* характеризуется

наибольшим риском развития мелкоклеточного варианта рака легкого. Гомозиготный вариант СС полиморфизма *XPB A751C* положительно ассоциирован с развитием опухоли легкого не-мелкоклеточного типа. Для больных раком легкого с очагами и без очагов метастазирования не получено статистически значимых различий в распределении полиморфных вариантов гена *XPB A751C*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова И. А., Дмитриева А. И., Ракитин С. С., Навицкий В. В. Полиморфизм генов-регуляторов клеточного цикла p53 и p21^{waf1/cip1} при раке легкого // Сиб. мед. журнал. – 2012. – № 3. – С. 47–50.
2. Buechner C.N., Heil K., Michels G. et al. Strand-specific Recognition of DNA Damages by XPD Provides Insights into Nucleotide Excision Repair Substrate Versatility // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289. – № 6. – P. 3613–3624.
3. Canalle R., da Silva S Andrade V., Scrideli C.A. et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase promoter and the DNA repair genes XRCC1 and XPD in a Brazilian population // J. Thorac. Oncol. – 2010. – Vol. 5. – № 9. – P. 1337–1345.
4. Gangwar R., Manchanda P.K., Mittal R.D. Implications of XRCC1, XPD and APE1 gene polymorphism in North Indian population: a comparative approach in different ethnic groups worldwide // Genetica. – 2009. – Vol. 136. – № 1. – P. 163–169.
5. Hu Z., Xu L., Shao M. Polymorphisms in the two helicases ERCC2/XPD and ERCC3/XPB of the transcription factor IIH complex and risk of lung cancer: a case-control analysis in a Chinese population // Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev. – 2006. – Vol. 15. – P. 1336–1340.
6. Huang D., Zhou Y. Nucleotide excision repair gene polymorphisms and prognosis of non-small cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: A meta-analysis based on 44 studies // Biomed. Rep. – 2014. – Vol. 2. – P. 452–462.
7. Kuper J., Braun C., Elias A. et al. In TFIIH, XPD Helicase Is Exclusively Devoted to DNA Repair // PLoS Biol. – 2014. – Vol. 12. – № 9. – P. e1001954.
8. Kuznetsova I.A., Yankovich K.I., Rakitin S.S., Dmitrieva A.I. Polymorphism of cell cycle regulating genes Bcl-2 (-938C A), Bax (-248G A) and p27 (-326T G) and the risk of lung cancer // International Journal of Biomedicine. – 2012. – Vol. 2–3. – P. 197–200.
9. Marshal A.L., Christiani D.C. Genetic susceptibility to lung cancer - light at the end of the tunnel? // Carcinogenesis. – 2013. – Vol. 34. – №3. – P. 487–502.
10. Mei C., Luo M., Li H. et al. DNA Repair Gene Polymorphisms in the Nucleotide Excision Repair Pathway and Lung Cancer Risk: A Meta-analysis // Chin. J. Cancer Res. – 2011. – Vol. 23. – № 2. – P. 79–91.
11. Park S.L., Fesinmeyer M.D., Timofeeva M. et al. Pleiotropic Associations of Risk Variants Identified for Other Cancers With Lung Cancer Risk: The PAGE and TRICL Consortia // J. Natl. Cancer. Inst. – 2014. – Vol.106 (4): dju061.
12. Samson M., Sing S.S., Rama R. et al. *XPD Lys751Gln* increases the risk of breast cancer // Oncol. Lett. – 2011. – Vol. 2. – №1. – P. 155–159.
13. Shen M., Berndt S.I., Rothman N. et al. Polymorphisms in the DNA nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in Xuan Wei, China // Int. J. Cancer. – 2005. – Vol. 116. – № 5. – P. 768–773.
14. Timofeeva M.N., Hung R.J., Rafnar T. et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls // Hum. Mol. Genet. – 2012. – Vol. 21 (22). – P. 4980–4995.
15. Xue H., Lu Y., Lin B. et al. The Effect of XPD/ERCC2 Polymorphisms on Gastric Cancer Risk among Different Ethnicities: A Systematic Review and Meta-Analysis // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 (9).
16. Yan Y., Liang H., Light M. et al. XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms and breast cancer susceptibility: A meta-analysis // Tumor Biology. – 2014. – Vol. 35 (3). – P. 1907–1915.
17. Zhan P., Wang Q., Wei S.Z. et al. *ERCC2/XPD Lys751Gln* and *Asp312Asn* gene polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis involving 22 case-control studies // J. Thorac. Oncol. – 2010. – Vol. 5 (9). – P. 1337–1345.
18. Zhang T., Zhang D., Zhao D. et al. Lack of association between the *XPD Lys751Gln* polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis // Onco. Targets Ther. – 2014. – № 7. – P. 1255–1260.
19. Zhou M., Wan H.Y., Gao B. L. et al. Genetic polymorphisms of XPD and CDA and lung cancer risk // Oncol. Lett. – 2012. – Vol. 4. – № 4. – P. 247–251.

Поступила в редакцию 25.09.2015 г.

A.I.Dmitrieva^{1,2}, V.A.Serebryakova^{1,2}, K I.A.uznetsova¹,
S.S.Rakitin^{1,2}, L.A.Kudryakov², V.V.Novitsky^{1,3},
K.I.Yankovich¹

The study of polymorphisms of XPD gene A751C in lung cancer patients with different clinical and morphological characteristics of tumor

¹Siberian State Medical University
²Tomsk Regional Oncology Dispensary
³National Research Tomsk State University
Tomsk

There were studied distribution of polymorphic variants of gene of repair of DNA XPD A751C in lung cancer depending on histological type of tumor (small cell / non-small cell lung cancer) and the prevalence of tumor process (with foci / without foci of metastasis). It was found a significant increase in the incidence of minor allele C, CC and AC genotypes of the polymorphic site of gene XPD A751C in patients with lung cancer. We estimated relative risks of lung cancer development in carriers of polymorphic variants of gene XPD A751C. The heterozygous genotype AC polymorphism of gene XPD A751C is characterized by the greatest risk of developing lung cancer with small cell histological type. Homozygous CC genotype of the polymorphic site of gene XPD A751C is associated with non-small cell lung cancer development. Statistically significant differences in the distribution of polymorphic variants of gene A751C XPD depending on spread of cancer were not received.

Key words: XPD A751C, polymorphism, lung cancer