

А.И. Дмитриева^{1,2}, В.А. Серебрякова^{1,2}, В.В. Новицкий^{1,3}, К.И. Янкович^{1,2},
Н.В. Севостьянова^{1,3}

Анализ распределения вариантов $-1026G>A$ и $-369G>C$ промоторной области гена $p21$ в когорте больных раком желудка с разными клинико-морфологическими характеристиками опухолевого процесса

¹ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России,

²ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»,

³НИ Томский государственный университет, Томск

Изучено распределение вариантов полиморфных сайтов $-1026G>A$ и $-369G>C$ гена $p21$ при раке желудка в зависимости от гистологического типа опухоли (интестинальный/диффузный рак желудка) и распространенности опухолевого процесса (с очагами/ без очагов метастазирования). Образцы ДНК, выделенной из морфологически неизменной ткани желудка, полученной с границы резекции у 200 больных раком желудка, протипированы по полиморфизмам $-1026G>A$ и $-369G>C$ гена $p21$ методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме «реального времени» с использованием соответствующих пар олигонуклеотидных праймеров и зондов. Носительство аллеля А и варианта АА полиморфного сайта $-1026G>A$, аллеля С и варианта СС полиморфного участка $-369G>C$ гена $p21$ статистически ассоциировано в большей степени с развитием диффузного рака желудка. В когорте больных раком желудка с наличием очагов метастазирования частота аллеля С, варианта GC и СС полиморфного участка $-369G>C$ и аллеля А, варианта АА полиморфного сайта $-1026G>A$ гена $p21$ значимо превышает таковую у больных раком желудка без метастазов.

Ключевые слова: $p21$ $-1026G>A$, $p21$ $-369G>C$, полиморфный сайт, рак желудка

Рак желудка - одно из наиболее часто встречающихся в мировой популяции злокачественных новообразований с неблагоприятным прогнозом [13]. В структуре онкологической заболеваемости у мужчин рак желудка устойчиво занимает четвертое место, у женщин - пятое [1, 4, 13]. Согласно эпидемиологическим исследованиям факторами риска развития рака желудка являются: чрезмерное потребление соли и жиров, недостаток в рационе овощей и фруктов, курение, злоупотребление алкоголем, избыточный вес, хронические заболевания желудка и инфекция грамотрицательной бактерией *H. pylori* [13, 15].

Показано, что модулирующую роль в формировании индивидуального риска развития рака играют не только факторы окружающей среды, но и генетические изменения, в частности однонуклеотидные полиморфизмы, определяющие генетическую предрасположенность к заболеванию [3, 6]. Необходимым условием неконтролируемой клеточной пролиферации является активация циклин-зависимых киназ, деятельность которых, наряду с циклинами, регулируется семейством $p21$ – белков ингибиторов циклин-зависимых киназ [2, 3]. Ген $p21$ картирован в локусе 6p.21.2, белок $p21$ содержит домен для связывания циклинов и циклин-зависимых киназ, и является основным эффекторным геном трансактивационного действия $p53$, ключевого регулятора процессов репарации и апоптоза [9]. Комплексы циклин D-Cdk4(6), циклин E-Cdk2 и циклин A-Cdk2 регулируют начальные этапы пресинтетической фазы G1 и переход из G1 в фазу синтеза ДНК. Их функциональную активность контролирует белок $p21$. Блокируя комплекс циклин B-Cdc2, белок $p21$ также способен ингибировать продвижение клетки по фазе G2 и вход в митоз [2, 7]. Очевидно, что наличие вариантов полиморфных сайтов гена $p21$ открывает возможности для изменения уровня контроля над остановкой клеточного цикла и элиминацией измененных клеток [2, 14], а, следовательно, для развития злокачественных новообразований различных локализаций, в том числе рака желудка.

Результаты исследований вариантов полиморфных сайтов гена $p21$ немногочисленны и преимущественно посвящены оценке одного полиморфизма $C98A$, локализованного в кодоне 31 и обуславливающего замену Ser на Arg в аминокислотной последовательности белка [10, 11, 12]. Данные литературы о наличии ассоциативной связи между экспрессией гена $p21$ и опухолями различных локализаций неоднозначны: мелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, рак шейки матки, головы, шеи связывают со снижением, рак простаты, молочной железы,

а также степень дифференцировки опухоли, напротив, с повышением экспрессии гена *p21* [5, 7, 8]. В исследовании И.Ю. Кузнецовой и соавт. установлена ассоциация аллеля А, варианта АА полиморфного сайта $-1026G>A$ и аллеля С полиморфного участка $-369G>C$ гена *p21* с увеличением риска развития рака легкого. Данные, посвященные оценке корреляции между полиморфизмами $-1026G>A$ и $-369G>C$ в промоторном регионе гена *p21* и риском развития рака желудка в европеоидной популяции, в современной литературе практически не встречаются.

Цель исследования: изучить распределение вариантов полиморфных сайтов $-1026G>A$ и $-369G>C$ гена *p21* при раке желудка в зависимости от гистологического типа опухоли и наличия очагов метастазирования.

Материалы и методы

Работа проведена на образцах операционного материала (гистологически верифицированные участки опухолевой ткани) 200 пациентов (75 женщин и 125 мужчин, средний возраст 56 ± 9 лет) с диагнозом рак желудка. В группу сравнения вошло 260 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 ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Деление пациентов на группы с очагами и без очагов метастазирования проводили в соответствии с международной классификацией злокачественных новообразований по системе TNM (7 Edition AJCC, 2009 г.). Первую группу ($n=142$, 71% случаев) составили пациенты без выявленных очагов метастазирования (T1-4N0M0), вторую группу ($n=58$, 29% случаев) – с очагами метастазирования, среди них больные с поражением регионарных лимфатических узлов (T1-4N1-2M0) – 39 пациентов, с сочетанными метастатическими поражениями регионарных лимфоузлов и отдаленных органов (T1-4N1-2M1) – 19 пациентов.

Число пациентов с интестинальным гистологическим типом опухоли составило 137 человек (первая группа), больных с диффузным типом рака желудка, представленного мелко-, полиморфно- и перстневидноклеточным раком – 63 человека (вторая группа). Деление больных на две группы проведено на основании результатов гистологического исследования биопсийного и операционного материала (выполненного в патологоанатомическом отделении ОГАУЗ “ТООД”) в соответствии с классификацией P. Lauren (1956 г.).

Для выделения ДНК больных раком желудка использовали парафиновые блоки с тканью, полученной при оперативном вмешательстве. Морфологически неизмененные клетки были получены с границы резекции. Для получения геномной ДНК использовали коммерческий набор “FF-PET DNA kit” (Qiagen, Германия). Предварительно проводили депарафинизацию образцов операционного материала.

Забор крови у здоровых индивидуумов проводили однократно. ДНК из лейкоцитов венозной крови здоровых доноров выделяли стандартным методом осаждения на сорбенте (набор “ДНК-сорб-АМ”, ФГУН “ЦНИИЭ” Роспо-

требнадзора, г. Москва). Лейкоциты получали в результате гомогенизации сгустка крови и многократной промывки автоклавированной дистиллированной водой в стерильных условиях.

Типирование выделенных образцов ДНК по полиморфным сайтам $-1026G>A$ и $-369G>C$ гена *p21* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» с гибридационно-флюоресцентной детекцией, используя соответствующие пары олигонуклеотидных праймеров и зондов [2].

Проверку гипотезы о достоверности различий между исследуемыми группами проводили с использованием критерия χ^2 Пирсона (при значении абсолютных частот больше 10) и критерия Фишера (при значении абсолютных частот меньше 5). Ассоциацию между риском развития заболевания и определенными генотипами оценивали, подсчитывая отношение шансов (OR). OR указан с 95%-ным доверительным интервалом (CI).

Результаты и обсуждение

*Частота встречаемости полиморфных сайтов $-1026G>A$ и $-369G>C$ гена *p21* у больных раком желудка и у здоровых доноров*

Проведенное исследование позволило установить, что у больных раком желудка частота встречаемости аллеля А и варианта АА полиморфного сайта $-1026G>A$ гена *p21* выше, чем у здоровых лиц (табл. 1). Риск развития рака желудка у носителей минорного аллеля А составил 1,8 (CI_{95%} 1,32 – 2,44), варианта АА – 3,0 (CI_{95%} 1,52 – 5,99).

При оценке полиморфного участка $-369G>C$ гена *p21* было показано, что у больных раком желудка частота встречаемости минорного аллеля С и гомозиготного варианта С статистически значимо ($p=0,001$) превышала таковую у здоровых индивидуумов (табл. 1). У носителей аллеля С риск развития рака желудка составил 1,8 (CI_{95%} 1,25 – 2,55), варианта СС полиморфного сайта $-369G>C$ гена *p21* – 3,3 (CI_{95%} 1,39 – 8,18).

*Частота встречаемости полиморфных сайтов $-1026G>A$ и $-369G>C$ гена *p21* у больных раком желудка с метастазами и без очагов метастазирования*

При делении пациентов на две группы в зависимости от наличия очагов метастазирования было установлено, что частота встречаемости минорного аллеля А и варианта АА полиморфного сайта $-1026G>A$ гена *p21* у больных раком желудка с метастазами выше аналогичных показателей у пациентов без выявленных очагов метастазирования в 1,5 и 2,3 раза (табл. 2).

Анализ полиморфного участка $-369G>C$ гена *p21* показал, что частота встречаемости GC- и CC-вариантов в группе больных с метастазами была значимо выше ($p=0,002$), чем у пациентов без метастазов. При наличии очагов метастазирования минорный аллель С встречался в 1,8 раза чаще (табл. 2).

Таблица 1. Частота встречаемости полиморфных сайтов -1026G>A и -369G>C гена p21 (в абс. знач. и в %) у больных раком желудка и у здоровых доноров

Группы	-1026G>A						-369G>C							
	Варианты			p ₁	Аллели		p ₂	Варианты			p ₁	Аллели		p ₂
	GG	GA	AA		G	A		GG	GC	CC		G	C	
Больные раком желудка, n=200	102 51,00%	67 33,50%	31 15,50%	0,001 χ ² =13,064	271 67,75%	129 32,25%	0,000 χ ² =14,440	132 66,00%	48 24,00%	20 10,00%	0,007 χ ² =9,963	312 78,00%	88 22,00%	0,001 χ ² =10,440
Здоровые доноры, n=260	168 64,62%	75 28,85%	17 6,54%		411 79,04%	109 20,96%		198 76,15%	53 20,38%	9 3,46%		449 86,35%	71 13,65%	

Примечание: p₁ – достоверность различий частоты вариантов по сравнению с показателями у здоровых доноров, p₂ – достоверность различий частоты аллелей по сравнению с показателями у здоровых доноров, χ² – стандартный критерий Пирсона для сравнения частоты вариантов и аллелей генов.

Таблица 2. Частота встречаемости полиморфных сайтов -1026G>A и -369G>C гена p21 (в абс. знач. и в %) у больных раком желудка с метастазами и без таковых

Больные раком желудка	-1026G>A						-369G>C							
	Варианты			p ₁	Аллели		p ₂	Варианты			p ₁	Аллели		p ₂
	GG	GA	AA		G	A		GG	GC	CC		G	C	
Без метастазов, n=142	78 54,93%	48 33,80%	16 11,27%	0,028 χ ² =7,155	204 71,83%	80 28,17%	0,009 χ ² =6,835	104 73,24%	25 17,61%	13 9,15%	0,002 χ ² =12,58	233 82,04%	51 17,96%	0,003 χ ² =8,53
С метастазами, n=58	24 41,38%	19 32,76%	15 25,86%		67 57,76%	49 42,24%		28 48,28%	23 39,66%	7 12,07%		79 68,10%	37 31,90%	

Примечание: p₁ – достоверность различий частоты вариантов по сравнению с показателями у больных раком желудка с метастазами; p₂ – достоверность различий частоты аллелей по сравнению с показателями у больных раком желудка с метастазами, χ² – стандартный критерий Пирсона для сравнения частоты вариантов и аллелей генов.

Таблица 3. Частота встречаемости полиморфных сайтов -1026G>A и -369G>C гена p21 (в абс. знач. и в %) у больных раком желудка с разными гистологическими типами опухоли

Группы	-1026G>A						-369G>C							
	Варианты			p ₁	Аллели		p ₂	Варианты			p ₁	Аллели		p ₂
	GG	GA	AA		G	A		GG	GC	CC		G	C	
Здоровые доноры, n=260	168 64,62%	75 28,85%	17 6,54%	0,038 χ ² =6,563 p [*] =0,302 χ ² =2,397	411 79,04%	109 20,96%	0,009 χ ² =6,827 p [*] =0,114 χ ² =2,499	198 76,15%	53 20,38%	9 3,46%	0,035 χ ² =6,732 p [*] =0,669 χ ² =0,803	449 86,35%	71 13,65%	0,009 χ ² =6,904 p [*] =0,644 χ ² =0,214
Интестинальный тип рака желудка, n=137	74 54,01%	45 32,85%	18 13,14%		193 70,44%	81 29,56%		91 66,42%	34 24,82%	12 8,76		216 78,83%	58 21,17%	
Диффузный тип рака желудка, n=63	28 44,44%	22 34,92%	13 20,63%	0,001 χ ² =14,873	78 61,90%	48 38,10%	0,000 χ ² =15,273	41 65,08%	14 22,22%	8 12,70%	0,010 χ ² =9,144	96 76,19%	30 23,81%	0,007 χ ² =7,179

Примечание: p₁ – достоверность различий частоты вариантов по сравнению с показателями у здоровых доноров, p₂ – достоверность различий частоты аллелей по сравнению с показателями у здоровых доноров, p^{*} – достоверность различий частоты вариантов и аллелей у больных интестинальным и диффузным гистологическими типами рака желудка, χ² – стандартный критерий Пирсона для сравнения частоты вариантов и аллелей генов у больных интестинальным и диффузным гистологическими типами рака желудка.

Полученные данные несомненно представляют значительный интерес с позиции оценки вклада изученных полиморфных сайтов гена p21 в определение опухолевой прогрессии, но для установления роли носительства изученных полиморфизмов в этом процессе необходимы дополнительные исследования.

Частота встречаемости полиморфных сайтов -1026G>A и -369G>C у больных интестинальным и диффузным гистологическим типом опухоли

Частота встречаемости аллеля А и варианта АА полиморфного сайта -1026G>A гена p21 у пациентов с интестинальным типом рака желудка достоверно (p<0,05) превышала таковую у

здоровых лиц (табл. 3). Риск развития интестинального гистологического типа рака желудка у носителей минорного аллеля А составил 1,6 (CI_{95%} 1,12 – 2,24), варианта АА – 2,4 (CI_{95%} 1,11 – 5,22).

Аналогичная тенденция в распределении частоты встречаемости аллелей и генотипов была установлена и для полиморфного участка -369G>C гена p21. Частота встречаемости варианта СС -369G>C гена p21 у больных интестинальным раком желудка превышала аналогичный показатель у здоровых лиц. Аллель С полиморфного сайта -369G>C гена p21 у больных интестинальным типом рака желудка встречался в 1,5 раза (p=0,009) чаще, чем у здоровых доноров. Для носителей аллеля С риск развития

рака желудка указанного гистологического типа был равен 1,7 (CI_{95%} 1,14 – 2,53), для носителей варианта CC – 2,9 (CI_{95%} 1,09 – 7,79).

У пациентов с диффузным раком желудка отмечалось статистически значимое увеличение частоты встречаемости аллеля А (p=0,000), а также вариантов AA и GA (p=0,001) полиморфного сайта -1026G>A гена p21 по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (табл. 3). Риск развития диффузного типа рака желудка для носителей GA-варианта полиморфного сайта -1026G>A составил 1,8 (CI_{95%} 0,90 – 3,42), AA-варианта – 4,6 (CI_{95%} 1,86 – 11,32), А-аллеля – 2,3 (CI_{95%} 1,50 – 3,59).

Частота встречаемости минорного аллеля С и варианта CC полиморфного сайта -369G>C гена p21 в группе пациентов с диффузным типом рака желудка также превышала аналогичные показатели в группе контроля (табл. 3). У здоровых носителей аллеля С риск развития диффузного типа рака желудка составил 2,0 (CI_{95%} 1,19 – 3,28), варианта CC – 4,3 (CI_{95%} 1,41 – 13,07).

Анализ распределения аллелей и вариантов полиморфных сайтов -1026G>A и -369G>C гена p21 при сравнении групп больных с различными гистологическими типами опухоли между собой не позволил установить статистически значимых отличий (табл. 3).

Заключение

Проведенное исследование показало, что варианты полиморфных участков -1026G>A и -369G>C гена p21 ассоциированы с повышенным риском развития злокачественных новообразований желудка. Носительство аллеля А и варианта AA полиморфного сайта -1026G>A, аллеля С и варианта CC полиморфизма -369G>C гена p21 ассоциировано в большей степени с развитием диффузного типа рака желудка. В когорте больных раком желудка с наличием очагов метастазирования частота аллеля С, варианта GC и CC полиморфного участка -369G>C и аллеля А, варианта AA полиморфного сайта -1026G>A гена p21 значимо превышает таковую у больных раком желудка без метастазов. Таким образом, определение вариантов полиморфных сайтов -1026G>A и -369G>C гена p21 с использованием методов расчета относительного риска позволяет оценить индивидуальную предрасположенность к заболеванию с целью проведения профилактических мероприятий и подбора схем химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (за-

болеваемость и смертность). – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2015.

2. Кузнецова И.А., Дмитриева А.И., Ракитин С.С., Новицкий В.В. Полиморфизм генов-регуляторов клеточного цикла p53 и p21WAF1/CIP1 при раке легкого // Сиб. мед. журн. – 2012. – № 3. – С. 47-53.
3. Наумова Л.А., Осипова О.Н. Рак желудка: отдельные механизмы патогенеза // Фунд. исслед. – 2015. – № 1-5. – С. 1072-1079.
4. Тишкова Е.Ю. Морфологическая характеристика и клиническое значение разных типов сосудов в ткани регионарных лимфатических узлов у больных раком желудка // Злок. опухоли. – 2014. – № 3. – С. 37-41.
5. Abbas T., Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities // Nat. Rev. Cancer. – 2009. – Vol. 9. – № 6. – С. 400-414.
6. Bellini M.F., Cadamuro A.C.T., Succi M. et al. Alterations of the TP53 Gene in Gastric and Esophageal Carcinogenesis // J. Biomed. Biotechnol. – 2012. – 891961.
7. Dong Z., Dang Y., Chen Y. Small double-stranded RNA mediates the anti-cancer effects of p21WAF1/CIP1 transcriptional activation in a human glioma cell line // Yonsei. Med. J. – 2014. – Vol. 55. – № 2. – P. 324-330.
8. Goto M., Tsukamoto T., Inada K. et al. Loss of p21WAF1/CIP1 expression in invasive fronts of oral tongue squamous cell carcinomas is correlated with tumor progression and poor prognosis // Oncol. Rep. – 2005. – № 14. – P. 837-846.
9. Kosaka M., Kang M.R., Yang G. et al. Targeted p21WAF1/CIP1 Activation by RNAi Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cells // Nucleic Acid Ther. – 2012. – Vol. 22. – № 5. – P. 335-343.
10. Lin G., Fang F., Ma H., Zhou Z. Meta-analysis of the relationship between p21 Ser31Arg polymorphism and lung cancer susceptibility // Genet. Mol. Res. – 2011. – Vol. 10. – № 4. – P. 2449-2456.
11. Ma H., Zhou Z., Wei S., Wei Q. Association between p21 Ser31Arg polymorphism and cancer risk: a meta-analysis // Chin. J. Cancer. – 2011. – Vol. 30. – № 4. – P. 254-263.
12. Shirai O., Ohmiya N., Taguchi A. et al. P53, p21 and h73 gene polymorphisms in gastric carcinoma // Hepatogastroenterology. – 2010. – Vol. 57. – № 104. – P. 1595-1601.
13. Wadhwa R., Song S., Lee J-S. et al. Gastric Cancer: Molecular and Clinical Dimensions // Nat. Rev. Clin. Oncol. – 2013. – Vol. 10. – № 11. – P. 643-655.
14. Zhang Z., Wang Z., Liu X. et al. Up-regulation of p21WAF1/CIP1 by small activating RNA inhibits the in vitro and in vivo growth of pancreatic cancer cells // Tumori. – 2012. – Vol. 98. – № 6. – P. 804-811.
15. Zhao Y., Feng F., Zhou Y-N. Stem cells in gastric cancer // World J. Gastroenterol. – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P. 112-123.

Поступила в редакцию 11.04.2018 г.

Abstract. The variants distribution of polymorphic sites -1026G>A and -369G>C of the p21 gene in gastric cancer according to tumor histological type (intestinal or diffuse gastric cancer) and the tumor stage (with or without metastases) was investigated. DNA samples isolated from the morphologically intact stomach tissue obtained from the resection margin from 200 gastric cancer patients via standard methods, were studied for polymorphisms -1026G>A and -369G>C of

the *p21* gene by real-time polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection using the appropriate pairs of oligonucleotide primers and probes. The carriage of allele A and genotype AA of the polymorphism -1026G>A, as well as allele C and genotype CC of the polymorphism -369G>C of the *p21* gene, were predominantly associated with diffuse histological type of gastric cancer. In the cohort of patients with metastatic gastric cancer, the frequencies of allele C, genotypes GC and CC of the polymorphism -369G>C, and allele A, genotype AA of the polymorphism -1026G>A of the *p21* gene, were statistically higher compared to the corresponding parameters of patients with non-metastatic gastric cancer.

Keywords: *p21* -1026G>A, *p21* -369G>C, polymorphic site, gastric cancer