

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ XRCC1, XRCC2, XRCC3  
У ЖИТЕЛЕЙ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ, БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО  
А. В. Рыжкова, В. И. Минина, М. Л. Баканова, Р. А. Титов, Ю. Е. Кулемин

POLIMORPHISM OF XRCC1, XRCC2, XRCC3 GENES IN LUNG CANCER PATIENTS  
AND HEALTHY PEOPLE OF KEMEROVO REGION

A. V. Ryzhkova, V. I. Minina, M. L. Bakanova, R. A. Titov, Yu. E. Kulemin

*Исследование проведено при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки РФ № 201464, программы «УМНИК» по Кемеровской области.*

Проведено исследование SNP в генах XRCC1 (Arg280His), XRCC2 (Arg188His), XRCC3 (Thr241Met) больных раком легкого и здоровых жителей Кемеровской области. Установлено, что в изученных выборках распределения частот аллелей и генотипов изученных полиморфных маркеров не имели отклонения от равновесия Харди-Вайнберга. Распространенность XRCC3Met в группе больных раком легкого статистически значимо выше, чем у здоровых жителей. Также, наблюдалось уменьшение частоты гомозигот Thr/Thr гена XRCC3 у больных раком легкого мужчин. Полученные данные представляют существенный интерес для эпидемиологических исследований наследственной предрасположенности к развитию рака легкого.

XRCC1 Arg280His, XRCC2 Arg188His, XRCC3 Thr241Met genes polymorphism in lung cancer patients and healthy people of Kemerovo region has been studied. It is established that in the studied samples of distribution of frequencies of alleles and genotypes of the studied polymorphic markers had no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The prevalence of XRCC3Met in the group of patients with lung cancer is statistically significantly higher than in healthy people. Also, there was a decrease in the frequency of Thr/Thr homozygotes of the XRCC3 gene in male patients with lung cancer. The obtained data are of significant interest for epidemiological studies of hereditary predisposition to the development of lung cancer.

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм XRCC1, XRCC2, XRCC3; рак легкого.

**Keywords:** XRCC1, XRCC2, XRCC3 genes polymorphism; lung cancer.

Изучение молекулярно-генетических механизмов предрасположенности к формированию злокачественных новообразований являются актуальным вопросом современной медицинской генетики. Установлена тесная взаимосвязь между нарушениями процессов метаболизма, дерегуляции клеточного цикла, роста и дифференцировки клетки, апоптоза, а также передачи сигналов с поверхности клеток в ядро. Исследования последних лет привели к формированию принципиально новых представлений о механизмах злокачественной трансформации клеток, имеющих повреждения ДНК, как о процессе, осуществляемом в соответствии с определенной генетической программой [1].

Рак легкого (РЛ) – это злокачественное новообразование, развивающееся из эпителиальной ткани легкого. К настоящему времени РЛ занимает первое место в онкозаболеваемости мужского населения России (18,9 %) и имеет наибольший удельный вес в структуре смертности от злокачественных новообразований (17,4 %) [4]. Развитие злокачественной опухоли – многофакторный и многостадийный процесс, в основе развития которого лежит сочетанное воздействие экзогенных и эндогенных факторов. К одним из наиболее важных эндогенных факторов следует отнести индивидуальные особенности функционирования защитных систем организма, среди которых активно последнее время исследуется молекулярный полиморфизм генов ферментов репарации ДНК [10; 15].

Система репарации ДНК является первым барьером на пути возникновения геномной нестабильности и канцерогенеза под действием мутагенов. Известно более 150 генов, принимающих участие в различных путях репарации [19]. При нарушении системы репара-

ции ДНК клетки проявляют повышенную чувствительность к действию различного рода мутагенов, что приводит в конечном итоге к повышенному уровню мутационных преобразований, гибели или злокачественному перерождению клеток [2].

Процесс ошибочной репарации повреждений ДНК, ДНК-аддукты, возникновение которых обусловлено активацией канцерогенов, генотоксических реакций, обусловленных экогенным взаимодействием. В эпителиоцитах трахеоальвеолярной системы легких и мононуклеарах периферической крови обнаружены межвидовые различия энзимов, репарирующих повреждения ДНК у курящих и не курящих табак, а также у пациентов и без наследственной предрасположенности к РЛ [17]. Исследования в данной области представляют существенный интерес для получения информации значимой именно для жителей Кузбасса, что позволит повысить возможности и эффективность профилактики РЛ у жителей нашего региона.

В связи с этим целью данного исследования стало изучение полиморфизмов генов ферментов репарации ДНК: rs25489XRCC1 Arg280His, rs3218536 XRCC2 Arg188His, rs861539 XRCC3 Thr241 Met у больных РЛ и здоровых жителей Кемеровской области.

**Материалы и методы**

В исследование включено 476 больных РЛ (средний возраст 59 лет), среди них 418 мужчин и 58 женщин, поступивших (первично) на лечение в Кемеровский областной клинический онкологический диспансер. В качестве популяционного контроля использовали выборку 369 условно здоровых лиц (средний

возраст 50 лет), 283 мужчины и 86 женщин, проживающих в г. Кемерово.

Работа соответствует стандартам биоэтического комитета, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.03 № 266. Все обследованные заполняли анкеты, подписывали форму информированного согласия.

Для изучения полиморфизма генов ферментов репарации ДНК из лейкоцитов периферической крови выделяли ДНК методом фенол-хлороформной экстракции и анализировали при помощи полимеразной цепной реакции синтеза ДНК. Генотипирование полиморфного маркера rs25489XRCC1Arg280His проводили с использованием метода «SNP-экспресс» и набора реактивов, разработанного НПФ «Литех» (г. Москва). Амплификацию ДНК проводили с помощью амплификатора «Терцик» (ДНК-технология). Продукты полимеразной реакции анализировали методом электрофореза в 3 % агарозном геле с бромистым этидием с последующей визуализацией фрагментов ДНК в ультрафиолетовом свете.

Типирование генов rs3218536 XRCC2 Arg188His, rs861539 XRCC3 Thr241 Met проводили методом

мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени. Амплификацию проводили с помощью амплификатора iCycleriQ5 (Bio-Rad, США). Полученные результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флуоресценции, специфичность оценивалась с помощью кривой плавления.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA for Windows 6.0». При сравнении частот генотипов применяли стандартный критерий  $\chi^2$  Пирсона. Различия статистически значимы при  $p < 0,05$ . Оценку соответствия распределений полиморфных вариантов равновесия Харди-Вайнберга осуществляли с использованием доступного интернет-ресурса: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

### Результаты и обсуждение

Установлено, что в изученных выборках больных РЛ и здоровых доноров распределения частот аллелей и генотипов изученных полиморфных маркеров не имели отклонения от равновесия Харди-Вайнберга.

На первом этапе мы изучили распределение генотипов генов: XRCC1, XRCC2, XRCC3 в группах, больных РЛ и здоровых лиц для выяснения их взаимосвязи с риском развития РЛ (таблица 1).

Таблица 1

Распределение генотипов генов XRCC1, XRCC2, XRCC3 в обследованных группах (оба пола)

Ген	Генотип	Больные раком легкого n (%)	Здоровые лица n (%)	$\chi^2; p$
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	366(76,72)	286(77,5)	0,02(0,8974)
	Arg/His	100(20,96)	78(21,13)	0,00(0,9688)
	His/His	10(2,32)	5(1,37)	0,30(0,5812)
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	377(88,08)	285(85,07)	1,23(0,26,71)
	Arg/His	49(11,44)	47(14,02)	0,92(0,3386)
	His/His	2(0,48)	3(0,73)	0,08(0,7829)
XRCC3 Thr241Met	Thr/ Thr	159(43,08)	171(51,81)	5,16(0,0231)*
	Thr/Met	160(43,56)	129(39,09)	1,07(0,3010)
	Met /Met	50(13,55)	29(8,78)	3,43(0,0641)

Примечание: \* $p < 0,05$  отличается от группы сравнения с аналогичным генотипом.

Ген XRCC1 локализован на хромосоме 19q13.2, является интегральным регулятором эксцизионной репарации оснований (ЭРО) [11]. Данная система обеспечивает защиту клетки от негативного воздействия агентов, модифицирующих азотистые основания ДНК и разрушающих ее сахаро-фосфатный остов. К таковым относятся разнообразие экзогенные и эндогенные генотоксические факторы [18].

Ген XRCC2 локализован на хромосоме 7q36.1, длина транскрипта составляет 307 аминокислот [8]. Принимает участие в репарации двунитевых разрывов путем гомологичной репарации [12]. Ген XRCC3 локализован на хромосоме 14q32.3, содержит 346 аминокислот. XRCC2, XRCC3 кодируют белки семейства RecA/Rad51, которые участвуют в гомологичной рекомбинации для поддержания стабильности хромосом и повреждений ДНК [16].

При генотипировании гена XRCC3 в группах жителей Кемеровской области было установлено, что в группе больных РЛ наблюдалось статистически зна-

чимое уменьшение частоты гомозигот Thr/Thr. Замена XRCC3 Thr241Met (C > T) увеличивает риск онкологических заболеваний, таких как рака щитовидной железы [6], опухоли глотки [13] и рака легких [7]. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что исследование полиморфизмов данного гена как маркеров индивидуальной чувствительности является перспективной задачей.

Распределение частот генотипов между полами не выявило никаких значимых различий между мужчинами и женщинами как в группе больных, так и в группе здоровых доноров. Наблюдаемые различия между РЛ и контролем достигали статистической значимости только у мужчин (таблица 2).

XRCC3 – кодирует белок семейства RecA/Rad51, участвующий в гомологичной рекомбинации, поддерживает хромосомную стабильность путем репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Клетки, не содержащие активный белок XRCC3, имеют дефекты ключевого фермента гомологичной рекомбинации

Rad51, при этом наблюдается генетическая нестабильность и повышение чувствительности ДНК к повреждающим агентам. Без защиты Rad51 другие белки атакуют ДНК, и это вызывает его повреждение, а

на протяжении долгого периода может спровоцировать развитие рака [14]. В ряде исследований были обнаружены ассоциации между полиморфизмом гена XRCC3 и риском развития рака легкого [7; 9].

Таблица 2

**Распределение генотипов генов XRCC1, XRCC2, XRCC3 в группах обследованных мужчин Кемеровской области**

Ген	Генотип	Больные раком легкого n (%)	Здоровые лица n (%)	$\chi^2; p$
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	325(77,75)	227(80,21)	0,47(0,4919)
	Arg/His	84(20,09)	53(18,72)	0,12(0,7256)
	His/His	9(2,16)	3(1,07)	0,64(0,4249)
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	325(88,31)	229(85,44)	0,89(0,3443)
	Arg/His	41(11,14)	36(13,43)	0,57(0,4522)
	His/His	2(0,55)	3(1,13)	0,13(0,7208)
XRCC3 Thr241Met	Thr/ Thr	136(42,36)	139(52,25)	5,53(0,0187)*
	Thr/Met	138(42,99)	105(39,47)	0,55(0,4597)
	Met /Met	47(14,65)	21(8,28)	5,75(0,0165)*

Примечание: \* $p < 0,05$  отличается от группы сравнения с аналогичным генотипом.

подавляющее большинство случаев РЛ (80–90 %) обусловлено курением. Известно, что фактор курения способен существенно модифицировать рисковую значимость генотипов. Поэтому на следующем этапе исследования был проведен анализ распределения частот генотипов с учетом фактора курения. При сравнении курящих и некурящих доноров отличий в распределении генотипов как в группе РЛ, так и здоровых доноров выявлено не было. Однако, при сравнении курящих больных РЛ и курящих здоровых было выявлено статистически значимое отличие частоты встречаемости генотипов Thr/Thr и Met/Met гена XRCC3 (таблица 3).

При разделении исследуемых групп в зависимости от пола, у некурящих женщин и мужчин различий выявлено не было. Статистически значимые отличия между группами РЛ и контроль были выявлены для курящих мужчин по генотипам Thr/Thr ( $\chi^2 = 4,33$ ;  $p = 0,0375$ ) и Met/Met ( $\chi^2 = 4,68$ ;  $p = 0,0305$ ) гена XRCC3, тогда как у женщин таких различий выявлено не было. Известно, что табачный дым содержит более 3800 химических веществ, многие из которых являются канцерогенными для человека. К ним относятся прежде всего полиароматические углеводороды, в том числе бенз(а)пирен (БП), 2-толуидин, 2-нафтиламин,

4-аминобифенил, никель, полоний-210 и ряд N-нитрозосоединений. Важным параметром, определяющим уровень N-нитрозосоединений в табачном дыме, является содержание в табаке нитратов [5].

**Заключение**

В результате проведенного исследования было установлено статистически значимое повышение частоты гомозигот Met/MetXRCC3 у курящих мужчин больных раком легкого, что может свидетельствовать о повышенной чувствительности отдельных людей к генотоксическому воздействию канцерогенов. Что же касается генотипа Thr/Thr гена XRCC3 – видно, что у больных этот генотип встречается реже, чем у здоровых доноров Кемеровской области. Это представляет интерес, так как на основе полученных результатов можно сделать вывод, что исследование полиморфизмов гена rs861539 XRCC3 Thr241Met как маркеров индивидуальной чувствительности является перспективной задачей. Проведенные нами исследования полиморфизма генов репарации имеет не только теоретическое значение, но и представляет интерес для эпидемиологических исследований наследственной предрасположенности к развитию рака легких у жителей Кемеровской области.

Таблица 3

**Распределение генотипов генов XRCC1, XRCC2, XRCC3 в обследованных группах курящих жителей Кемеровской области (оба пола)**

Ген	Генотип	Больные раком легкого n (%)	Здоровые лица n (%)	$\chi^2; p$
XRCC1 Arg280His	Arg/Arg	314(78,10)	133(80,6)	0,30(0,5838)
	Arg/His	80(19,9)	32(19,4)	0,00(0,9828)
	His/His	8(2,00)	0(0,00)	2,05(0,1519)
XRCC2 Arg188His	Arg/Arg	314(88,70)	133(84,71)	1,24(0,2664)
	Arg/His	38(10,73)	24(15,29)	1,71(0,1912)
	His/His	2(0,57)	0(0,00)	0,03(0,8604)
XRCC3 Thr241Met	Thr/ Thr	132(42,3)	81(52,25)	3,99(0,0457)*
	Thr/Met	134(42,91)	61(39,35)	0,34(0,5570)
	Met /Met	46(14,79)	12(7,74)	3,96(0,0467)*

Примечание: \* $p < 0,05$  отличается от группы сравнения с аналогичным генотипом.

**Литература**

1. Викторова Т. В., Корытина Г. Ф., Янбаева Д. Г. Взаимодействие генетических и внешнесредовых факторов в процессе развития хронических obstructивных болезней легких // Медицинская генетика. 2003. Т. 2. № 2. С. 50 – 59.
2. Гурцевич С. А., Галецкий С. Н., Неред С. Н., Новикова Е. В., Яковлева Л. С., Лэнд Ч. Э., Давыдов М. И., Клименков А. А., Петровичев Н. Н., Токунага М. Обнаружение и характеристика опухолей желудка, ассоциированных с вирусом герпеса Эпштейна-Барр // Вестник РАМН. 2000. № 3. С. 56 – 59.
3. Мерабишвили В. М., Дятченко О. Т. Статистика рака легкого (заболеваемость, смертность, выживаемость) // Практическая онкология. 2000. Т. 3. С. 3 – 7.
4. Чиссов В. И., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (Заболеваемость и смертность) // Москва: ФГУ «МНИОИ им. П. А. Герцена Росмедтехнологий». 2013. 289 с.
5. Alberg A. J., Samet J. M. Epidemiology of lung cancer // Chest. 2003. Jan. 123(1 Suppl). S. 21 – 49.
6. Benhamou S., Tuimala J., Bouchardy C., Dayer P., Sarasin A., Hirvonen A. DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract Int // J Cancer. 112.(5). 2004. P. 901 – 904.
7. Butkiewicz D., Rusin M., Enewold L., Shields P. G., Chorazy M., Harris C. C. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer // Carcinogenesis. 2001. 22(4). P. 593 – 597.
8. Carney J. P., Maser R. S., Olivares H., Davis M., Le Beau. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen break syndrome: linkage of double strand break repair to cellular DNA damage response // Cell. 1998. Vol. 93. P. 477 – 486.
9. David-Beabes G. L., Lunn R. M., London S. S. No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2001. 10. P. 911 – 912.
10. De Ruyck K., Szaumkessel M., De Rudder I., Dehoorne I., Vral A., Claes K. Polimorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk // Mutat Res. 2007. Vol. 28. P. 101 – 110.
11. M. Hou S., Falt S., Andelini S., Yang K., Nyberg F., Lambert B., Hemmiki K. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk // Carcinogenesis. 2002. V. 23. P. 599 – 603.
12. Jiao L., Hassan M. M., Bondy M. L., Wolff R. A., Evans D. B., Abbruzzese J. L. XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer // Am J Gastroenterol. 2008. Feb. 103(2): 360-7.
13. Manuguerra M., Saletta F., Karagas M. R., Berwick M., Veglia F., Vineis P., Matullo G. XRCC3 and XPD/ERCC2 single nucleotide polymorphisms and the risk of cancer: a HuGE review // Am. J. Epidemiol. 164. 2006. P. 297 – 302.
14. Matullo G., Palli D., Peluso M., Guarrera S., Carturan S., Cementano E., Krogh V., Munnia A., Tumino R., Polidoro S., Piazza A., Vineis P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and 32P-DNA adducts in a sample of healthy subjects // Carcinogenesis. 2001. 22: 1437 – 1445.
15. Qian B., Zhang H., Zhang L., Zhou X., Yu H., Chen K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk // Lung Cancer. 2011. Vol. 73. P. 138 – 146.
16. Tuimala J. Inherited DNA repair capacity and individual responses to carcinogens // Department of Industrial Hygiene and Toxicology. Helsinki, 2004.
17. Wei Q., Cheng L., Amos C. I., Wei L. E. Q., Cheng L., Amos C. I., Wang L. E., Guo Z., Hong W. K., Spitz M. R. Repair of tobacco carcinogen – induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study // J. Natl. Cancer Inst. 2000. V. 92. P. 1764 – 1772.
18. Wood R. D., Mitchel M., Sgouros J., Lindahl T. Human DNA repair genes // Science. 2001. V. 291. P. 1284 – 1289.
19. Wood R. D., Mitchell M., Lindahl T. Human DNA repair genes // Mutat. Res. 2005. V. 577. P. 275 – 283.

**Информация об авторах:**

**Рыжкова Анастасия Владимировна** – аспирант, инженер-технолог ИЭЧ СО РАН, kotia1490@mail.ru.

**Anastasiya V. Ryzhkova** – post-graduate student, engineer at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

**Минина Варвара Ивановна** – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики КемГУ, заведующая лабораторией цитогенетики ИЭЧ СО РАН, vminina@mail.ru.

**Varvara I. Minina** – Candidate of Biology, Assistant Professor at the Department of Genetics, Kemerovo State University; Head of Cytogenetics Laboratory at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

**Баканова Марина Леонидовна** – младший научный сотрудник ИЭЧ СО РАН, mari-bakano@ya.ru.

**Marina L. Bakanova** – Junior Research Associate at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

**Титов Руслан Александрович** – аспирант, инженер-технолог ИЭЧ СО РАН, Ruslan-Tito00@Rambler.ru

**Ruslan A. Titov** – post-graduate student, engineer at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

**Кулемин Юрий Евгеньевич** – аспирант КемГУ, инженер-технолог ИЭЧ СО РАН, jura.kulemin@gmail.com.

**Yuriy E. Kulemin** – post-graduate student at the Department of Genetics, Kemerovo State University; engineer at the Institute for Human Ecology of the Siberian branch of the RAS.

*Статья поступила в редколлегию 28 июля 2014 г.*