

Н.Н. ЧАКОВА<sup>1</sup>, Е.П. МИХАЛЕНКО<sup>1</sup>,  
С.Н. ПОЛОНЕЦКАЯ<sup>1</sup>, Н.В. ЧЕБОТАРЕВА<sup>1</sup>,  
Ю.Е. ДЕМИДЧИК<sup>2</sup>, А.А. ЖИЛКО<sup>2</sup>,  
О.В. КВИТКО<sup>1</sup>, Э.В. КРУПНОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии Национальной академии наук  
Беларуси, Минск

E-mail: n.chakova@igc.bas-net.by

<sup>2</sup>Минский городской клинический онкологический диспансер

## ПОЛИМОРФИЗМ GST-ГЕНОВ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНИ ЛЕГКОГО БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО



*Обнаружено, что носители делеции гена GSTT1 более подвержены риску возникновения немелкоклеточного рака легкого, чем носители нормального генотипа GSTT1(+). Изучение связи полиморфизма GST-генов и цитогенетических показателей у больных раком легкого показало достоверное превышение среднегруппового уровня клеток с микроядрами у больных НМРЛ с GSTT1(-), причем у курящих пациентов с мутантным генотипом частота клеток с микроядрами была выше по сравнению с курящими носителями генотипа GSTT1(+).*

© Н.Н. ЧАКОВА, Е.П. МИХАЛЕНКО, С.Н. ПОЛОНЕЦКАЯ,  
Н.В. ЧЕБОТАРЕВА, Ю.Е. ДЕМИДЧИК, А.А. ЖИЛКО,  
О.В. КВИТКО, Э.В. КРУПНОВА, 2009

**Введение.** Экономические и социальные последствия устойчивого роста заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них делают актуальной разработку и совершенствование методов ранней диагностики и прогноза течения рака. На сегодняшний день решение этих вопросов связывают с молекулярно-генетическими исследованиями, которые позволяют выявлять гены, вовлеченные в процесс канцерогенеза.

Основными внешними факторами, вызывающими развитие онкопатологии, в том числе и рака легкого, является загрязнение окружающей среды различными химическими и радиоактивными веществами. Уровень генетических повреждений клеток, вызываемых канцерогенами, в немалой степени зависит от индивидуальной чувствительности соматических клеток к этим генотоксическим агентам, которая определяется прежде всего активностью систем репарации и элиминации клеток, а также функционированием антиоксидантных ферментов. Среди них ключевая роль отводится глутатионтрансферазам (GST), которые принимают участие в детоксикации активированных цитохромом P450 реактивных метаболитов во второй фазе ферментативной биотрансформации ксенобиотиков. Наиболее изученными из этих ферментов являются глутатионтрансферазы класса  $\theta$  (GSTM1) и класса  $\mu$  (GSTT1). Наличие гомозиготной делеции («нулевой генотип») хотя бы по одному из этих генов связывают с увеличением риска заболевания различными формами рака, в том числе и немелкоклеточным раком легкого [1]. В результате сниженной детоксикации метаболитов в реакциях биотрансформации повышается вероятность повреждения «критических генов», участвующих в регуляции клеточного роста, процессов репарации, гибели клеток, непосредственно влияющих на развитие канцерогенеза [2].

Степень чувствительности к генотоксическим агентам скорее всего определяется балансом активностей различных глутатион-S-трансфераз, поскольку они полиморфны и имеют перекрывающуюся субстратную специфичность [3]. В этом случае отсутствие функционирования одного гена может компенсироваться активностью других GST, поэтому исследование полиморфизма GST требует комплексного подхода с привлечением данных по нескольким генам одновременно.

Анализ данных связи наследуемого функционального дефицита глутатион-S-трансферазы (GSTM1 и GSTT1) с генетическими нарушениями также подтверждает непосредственное участие фермента в метаболических путях, которые обеспечивают защиту клеток от химических и радиоактивных канцерогенов, индуцирующих повреждение ДНК [4]. Большой интерес в связи с этим представляет цитогенетическое проявление неблагоприятного генотипа и возможность создания на этой основе идентификации подгрупп людей высокого риска развития онкологических патологий вообще и рака легкого в частности.

**Материалы и методы.** Обследовали 70 больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), проходивших лечение в Минском городском клиническом онкологическом диспансере (курящих – 49, некурящих – 21). Диагноз НМРЛ у всех больных был подтвержден цитологически и гистологически. При оценке полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 контрольная группа была представлена выборкой из 103 человек без онкопатологии, проживающих в г. Минске. Анамнез курения был известен у 80 человек, среди них 22 некурящих и 58 курящих. Исследуемые выборки были представлены лицами белорусской национальности.

ДНК для молекулярного исследования выделяли из лимфоцитов периферической крови с использованием фенольно-хлороформной экстракции [5]. Типирование образцов по генам GSTM1 и GSTT1 проводили мультиплексной ПЦР, описанной Arand et al. [6], с использованием трех пар олигонуклеотидных праймеров (табл. 1).

Смесь для амплификации объемом 25 мкл включала 100–200 нг ДНК, 0,3 мкл каждого праймера, 50 мМ трис HCl (pH 8,4), 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, а также 2 мМ каждого dNTP и 1U Taq-полимеразы. Температура отжига праймеров – 64 °С. Продукты амплификации фракционировали в 1,8%-ном агарозном геле с бромистым этидием в течение 40 мин при напряжении 100 В и визуализировали в УФ-свете. Гомозиготы и гетерозиготы по нормальному аллелю «+» для генов GSTM1 и GSTT1 определяли на электрофореграммах по наличию продукта амплификации размером 215 п.н. (GSTM1) и фрагмента 480 п.н. (GSTT1). Отсут-

ствие соответствующих фрагментов указывало на гомозиготность индивидуума по делеции обоих аллелей. В качестве внутреннего контроля использовали амплификацию фрагмента гена альбумина. Гетерозиготные особи «-/+» в наших экспериментах не идентифицировались.

Для цитогенетических исследований использовали метод интерфазного анализа соматических клеток без культивирования. В клетках легкого на послеоперационных мазках – отпечатках с неопухоловой ткани больных раком легкого оценивали частоту клеток с микроядрами [7]. В качестве контроля для цитогенетического анализа использовали аутопсийный материал из патологоанатомического бюро от 23 человек из Минска, умерших по причинам, не связанным с онкологическими заболеваниями.

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0». При сравнении частот генотипов использовали стандартный критерий  $\chi^2$  Пирсона. В том случае, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий Фишера. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к НМРЛ судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR), которую рассчитывали по стандартной формуле  $OR = (A/B)/(C/D)$ , где A и B – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный генотип соответственно; C и D – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих мутантный генотип. OR

Таблица 1  
Праймеры, использованные в работе

Праймеры	Последовательность	Длина продукта, п.н.
GSTM1 (F)	GAACTCCCTG AAAAGCTAAA-GC	215
GSTM1 (R)	GTTGGGCTCA AATATACGGT-GG	
GSTT1 (F)	TTCCTTACTG GTCCTCACAT-CTC	480
GSTT1 (R)	TCACCGGATC ATGGCCAGCA	
Albumin (F)	GCCCTCTGCT AACAAGTCCT-AC	350
Albumin (R)	GCCCTAAAAA GAAAATCGCC-AATC	

указан с 95%-ным доверительным интервалом. OR, рассчитанные сопоставлением частот только некурящих больных и здоровых людей или, наоборот, рассчитанные только для курящих больных и здоровых людей, показывают влияние генотипа ( $OR_g$ ) на риск возникновения рака легких, но в разных условиях окружающей среды. OR, рассчитанные путем сопоставления частот курящих больных и некурящих здоровых людей, учитывают взаимодействие генетического признака и внешнего фактора ( $OR_{g+f}$ ). Если влияние этих факторов однонаправлено, то величина  $OR_{g+f}$  будет выше, чем  $OR_g$  для некурящих. Если же влияние этих факторов разнонаправлено, то  $OR_{g+f}$  будет ниже [8].

Для оценки ассоциации исследуемых генотипов с уровнем клеток с микроядрами использовали t-критерий.

**Результаты исследований и их обсуждение.**

Хорошо известно, что в этиологии заболевания раком легкого не последнее место занимает курение. В группе обследованных нами больных с такой патологией 70 % оказались курильщиками. У этих пациентов рак легкого возник в более раннем возрасте (60,3 года) по сравнению с некурящими (66,5 года). Данные по генотипированию GSTM1 и GSTT1 с учетом статуса курения представлены в табл. 2.

В контрольной группе частота встречаемости нуль-генотипов GSTM1 и GSTT1 составляла 41,7 и 12,6 %, что соответствует литературным данным о распространенности нуль-гено-

типов GSTM1 и GSTT1 в западноевропейских популяциях [9]. В группе пациентов с НМРЛ частота генотипа GSTM1(-) не отличалась от контрольной группы. Иную ситуацию наблюдали в отношении генотипа GSTT1(-), частота встречаемости которого у больных была достоверно выше в 2,4 раза по сравнению с контролем, что, по-видимому, указывает на доминирующую роль GSTT1(-) в формировании предрасположенности к НМРЛ.

Для генотипа GSTM1(-) величины  $OR_g$  в группах курящих и некурящих больных не различались. Для генотипа GSTT1(-) у некурящих величина  $OR_g$  достигла величины 5,0 и являлась статистически значимой, в то же время в группе курящих выявлено недостоверное повышение  $OR_g$ . Более высокая величина OR для генотипа GSTT1(-) у некурящих людей по сравнению с курящими может объясняться большей чувствительностью носителей нуль-генотипа к патогенным эффектам загрязнителей окружающей среды в области низких концентраций. Такая закономерность была обнаружена и другими исследователями в отношении многих генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков: некурящие носители мутаций этих генов подвергаются большему риску развития рака легкого по сравнению с некурящими носителями аллелей дикого типа [9]. Для курящих больных наличие мутантных аллелей ферментов биотрансформации в развитии рака легкого, очевидно, не является столь определя-

Таблица 2

**Ассоциация генотипов GST с риском возникновения НМРЛ**

Признак	Встречаемость, %						Отношение шансов (95%-ный доверительный интервал)									
	НМРЛ			Контроль			Всего	Некурящие	Курящие	$(OR_{g+f})$						
	Всего	Не- курящие	Курящие	Всего	Не- курящие	Курящие										
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	$(OR_g)$	$(OR_g)$	$(OR_g)$			
GSTM1(-)	29	41,1	10	47,6	19	38,0	43	41,7	11	50,0	22	37,9	0,99 (0,53–1,83)	0,91 (0,27–3,01)	1,04 (0,47–2,27)	0,63 (0,23–1,75)
GSTM1(+)	41	58,9	11	52,4	30	62,0	60	58,3	11	50,0	36	62,1				
GSTT1(-)	21	30,0	7	33,3	14	28,5	13	12,6	2	9,1	10	17,2	2,97 ** (1,37–6,44)	5,00 * (0,90–27,74)	1,92 (0,76–4,82)	4,00 (0,82–19,42)
GSTT1(+)	49	70,0	14	66,7	35	71,5	90	87,4	20	91,9	48	82,8				

Примечание. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; p – уровень значимости различий по критерию  $\chi^2$  в сравнении с аналогичными группами в контроле.

ющим. По-видимому, курение, будучи комплексным фактором риска, вовлекает множество других существенных механизмов развития заболевания, в частности, вызывает более высокую экспрессию энзимов, участвующих в репарации повреждений ДНК [10]. Оценка относительного риска генотипов в сочетании с курением ( $OR_{g+}$ ) также подтвердила, что курение модифицирует рисковую значимость генотипов в возникновении рака легкого.

Нужно отметить, что связь генов ферментов биотрансформации, в том числе GST, с риском возникновения рака легкого активно изучается многими исследовательскими коллективами, при этом имеются достаточно противоречивые данные. В работе Raimondi et al. [11] не было выявлено связи между делецией в гене GSTT1 и развитием рака легкого, а также между статусом GSTT1 и курением в отношении этого заболевания. В то же время в работе немецких ученых [12] показано, что наличие нуль-генотипа GSTT1 увеличивало риск заболевания у курильщиков. Российские исследователи [13, 14] показали достоверное увеличение нулевого генотипа гена GSTT1 у больных раком легкого и пациентов с хроническими неспецифическими заболеваниями легких. Противоречивость данных, полученных различными исследователями, может быть объяснена реально существующими различиями в генотипической структуре изучаемых популяций. В частности, различные этнические группы могут обладать неодинаковым соотношением аллелей генов ферментов, обладающих сходной с глутатион-S-трансферазами субстратной специфичностью.

Известно, что мутации в генах детоксикации сопровождаются изменением уровня цитогенетических показателей в соматических клетках [10]. Можно предположить, что сниженная активность или отсутствие некоторых ферментов второй фазы детоксикации способствует более длительному сохранению в организме промежуточных продуктов биотрансформации ксенобиотиков, которые могут быть весьма токсичными, проявлять выраженную мутагенную активность и вследствие этого являться причиной различных патологических состояний легкого [14]. В результате проведенного нами цитогенетического исследования неопухолевой ткани легкого выявлено отсутствие

Таблица 3  
**Цитогенетический анализ неопухолевой ткани у больных НМРЛ с различным генотипом по GSTT1**

Генотипы	Частота клеток с микроядрами, $\bar{x} \pm S_x$ , %
Больные НМРЛ	
GSTT1(+)	0,32 ± 0,04
GSTT1(-)	0,51 ± 0,07 *
Контрольная группа	
GSTT1(+)	0,24 ± 0,03
GSTT1(-)	0,27 ± 0,02

\* Достоверная разница с обладателями генотипа GSTT1(+) ( $p < 0,05$ ).

Таблица 4  
**Цитогенетический статус курящих и некурящих больных НМРЛ в зависимости от генотипа**

Генотипы	Частота клеток с микроядрами, $\bar{x} \pm S_x$ , %
Курящие пациенты	
GSTT1(+)	0,30 ± 0,04
GSTT1(-)	0,57 ± 0,09*
Некурящие пациенты	
GSTT1(+)	0,37 ± 0,10
GSTT1(-)	0,40 ± 0,10

\* Достоверная разница с обладателями генотипа GSTT1(+) ( $p < 0,05$ ).

различий в частоте клеток с микроядрами у людей с генотипами GSTT1(-) и GSTT1(+) в контрольной группе и показано статистически достоверное превышение среднегруппового уровня этого показателя у больных НМРЛ с мутантным генотипом (табл. 3).

В связи с тем, что у курящих и некурящих пациентов наблюдалось различное соотношение мутантных и немутантных генотипов GSTT1, полученные данные цитогенетического анализа неопухолевой ткани легкого оценены нами с учетом фактора курения (табл. 4).

В клетках неопухолевой ткани легкого у больных НМРЛ без учета генотипов не обнаружено различий в средних уровнях исследуемых показателей у курящих и некурящих пациентов. Однако у курящих пациентов с генотипом GSTT1(-) было показано статистически досто-



верное превышение среднегруппового уровня клеток с микроядрами ( $0,57 \pm 0,09 \%$ ) по сравнению с GSTT1(+) ( $0,30 \pm 0,04 \%$ ). В то же время у некурящих пациентов не обнаружено связи между генотипом GSTT1 и уровнем мутационного процесса в неопухоловой ткани легкого: частота клеток с микроядрами не различалась у GSTT1(-) —  $0,40 \pm 0,10 \%$  и GSTT1(+) —  $0,37 \pm 0,10 \%$ . Одним из объяснений этого факта служит непосредственное повреждающее воздействие канцерогенов табачного дыма на ткань легкого, что в сочетании с мутантным геном GSTT1 приводит к высокой вероятности возникновения цитогенетических повреждений.

Таким образом, результаты нашей работы позволяют сделать предварительный вывод о том, что носители делеции гена GSTT1 в белорусской популяции более подвержены риску возникновения рака легкого, чем носители нормального генотипа GSTT1(+), и указывают на модифицирующее влияние факторов курения и полиморфизма гена GSTT1(-) на выход клеток с хромосомными aberrациями. Изучение ассоциации полиморфизма генов детоксикации с возникновением рака легкого позволяет сделать вывод о том, что для оценки того или иного генотипа как фактора риска необходимы знания о спектре канцерогенов, воздействию которых подвергается население той или иной территории, а также условий жизни отдельных людей, входящих в исследуемые группы (вредность на производстве, курение, диета). В зависимости от природы химических соединений, входящих в состав загрязнителей конкретной территории, может меняться степень риска, связанная с геном и его продуктом. Более того, то, что являлось фактором риска в одних условиях, может стать фактором устойчивости в других [15].

*N.N. Chakova, E.P. Mikhailenko,  
S.N. Polonetskaya, N.V. Chebotareva, Yu.E. Demidchik,  
A.A. Zilko, O.V. Kvitko, E.V. Krupnova*

#### GST POLYMORPHISM AND CYTOGENETIC CHANGES IN LUNG TISSUES OF LUNG CANCER PATIENTS

Carriers of GSTT1 gene deletion were found to be more subjected to a risk of emerging non-small-cell lung cancer (NSLC) than those of normal GSTT1(+) genotype. Study on the relation between GST gene polymorphism

and cytogenetic indices in lung cancer patients has shown a significant excess of the group average level in cells with micronuclei in NSLC patients with GSTT1(-). The frequency of cells with micronuclei was higher in smoking patients with a mutant genotype than in smoking carriers of the GSTT1(+) genotype.

*N.N. Chakova, E.P. Mikhailenko,  
S.N. Polonetskaya, N.V. Chebotareva, Yu.E. Demidchik,  
A.A. Zilko, O.V. Kvitko, E.V. Krupnova*

#### ПОЛІМОРФІЗМ GST-ГЕНІВ ТА ЦИТОПЛАЗМАТИЧНІ ЗМІНИ В ТКАНИНІ ЛЕГЕНІВ У ХВОРИХ РАКОМ ЛЕГЕНІВ

Виявлено, що носії делеції гена GSTT1 більш схильні до ризику виникнення немілкоклітинного раку легень (НМРЛ), ніж носії нормального генотипу GSTT1(+). Вивчення зв'язку поліморфізму GST-генів та цитогенетичних показників у хворих раком легень показало вірогідне перевищення середньогрупового рівня клітин з микроядрами у хворих НМРЛ з GSTT1(-), до того ж у пацієнтів, що палять, з мутантним генотипом частина клітин з микроядрами була вище порівняно з носіями генотипу GSTT1(+), що палять.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bartsch H., Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure // Environ. Health. Perspect. — 1996. — **104**, № 13. — P. 569–577.
2. Raunio H., Husgafvel-Pursiainen K., Anttila S. et al. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility—a review // Gene. — 1995. — **159**, № 1. — P. 113–121.
3. Knudson A.G.Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes // Cancer Res. 1985. — **45**, № 4. — P. 1437–1443.
4. Karahalil B., Sardas S., Kocabas N.A. et al. Chromosomal aberrations under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the GSTM1 genotype // Mutat. Res. — 2002. — **515**, № 1/2. — P. 135–140.
5. Lahiri D.K., Bye S., Nurnberger J.I. Jr., Hodes M.E., Crisp M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested // J. Biochem. Biophys. Meth. — 1992. — **25**, № 4. — P. 193–205.
6. Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms // Anal. Biochem. — 1996. — **236**, № 1. — P. 184–186.
7. Schmid W. The micronucleus test // Mutat. Res. — 1975. — **31**, № 5. — P. 9–15.

8. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Макарова С.И. и др. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков в предрасположенности к бронхиальной астме и формировании особенностей ее клинического фенотипа // Вестн. Рос. академии мед. наук. – 2000. – № 12. – С. 36–41.
9. Drakoulis N., Cascorbi I., Brockmoller J. et al. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region // Clin. Investig. – 1994. – 72, № 3. – P. 240–248.
10. Marcon F., Andreoli C., Rossi S. et al. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population // Mutat. Res. – 2003. – 541, № 1/2. – P. 1–8.
11. Raimondi S., Paracchini V., Autrup H. et al. Meta- and pooled analysis of GSTT1 and lung cancer: a HuGE-GSEC review // Amer. J. Epidemiol. – 2006. – 164, № 11. – P. 1027–1042.
12. Schneider J., Berges U., Philipp M., Weitowitz H.J. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking // Cancer. Lett. – 2004. – 208, № 1. – P. 65–74.
13. Дмитриева А.И., Новицкий В.В., Севостьянова Н.В. и др. Изучение полиморфизма генов GSTT1 и GSTM1 у больных раком легкого // Бюл. СО РАМН. – 2004. – № 1. – С. 60–62.
14. Иващенко Т.Э., Сиделева О.Г., Петрова М.А. и др. Генетические факторы предрасположенности к бронхиальной астме // Генетика. – 2001. – 37, № 1. – С. 107–111.
15. Гуляева Л.Ф., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. Сер. Экология. – Новосибирск, 2000. – Вып. 57. – 85 с.

Поступила 19.12.07