

Резюме

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності за допомогою тесту «G₂-bleomycin sensitivity assay» проведено добровільне цитогенетичне обстеження 53-х осіб з радіаційним впливом різної інтенсивності. Отримані дані підтвердили реальність модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження внаслідок дії високих доз іонізуючого випромінювання.

Для выявления скрытой хромосомной нестабильности с помощью теста «G₂-bleomycin sensitivity assay» проведено добровольное цитогенетическое обследование 53-х лиц с радиационным воздействием разной интенсивности. Полученные данные подтвердили реальность модификации генетически обусловленной чувствительности хромосом соматических клеток человека к тестирующей мутагенной нагрузке вследствие действия высоких доз ионизирующего излучения.

For the revealing of hidden chromosome instability with the help of “G₂-bleomycin sensitivity assay” the voluntary observation of 53 persons with different intensity of radiation exposure had been fulfilled. The data received confirmed the reality of modification by high doses of ionizing radiation the inherited susceptibility of human somatic cells chromosomes to testing mutagenic exposure.

ПИЛИПЕНКО И.В.¹, ЧЕРДЫНЦЕВА Н.В.², КОБЗЕВ В.Ф.¹, ВОЕВОДА М.И.^{1,3}, РОМАЩЕНКО А.Г.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,

²НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск,

³НИИ Терапии СО РАМН, Новосибирск,

Россия, 630090, Новосибирск, ул. пр. ак. Лаврентьева, 10, e-mail: myagkova_irina@rambler.ru

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА P53 С ФОРМИРОВАНИЕМ И РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ОПУХОЛИ

В последние годы наблюдается тенденция увеличения доли гормонозависимых опухолей органов репродуктивной системы у женщин со злокачественными новообразованиями. Это является следствием возрастания в популяции лиц с эндокринно-обменными нарушениями (ановуляция, гиперэстрогения, бесплодие, ожирение, сахарный диабет и т.д.). Кроме того, в патогенез гормонозависимых/независимых опухолей продолжают вносить существенный вклад генетические и внешние факторы (канцерогены). В результате в экономически развитых странах отмечено заметное превалирование рака молочной железы (РМЖ) над другими типами новообразований.

Молекулярные фенотипы эпителиальных клеток молочной железы различаются в норме концентрацией цитоплазматических и ядерных рецепторов женских гормонов, которые участвуют во многих клеточных процессах (экспрессии генов, дифференцировке и размножении клеток и т.д.). Малигнизированные эпителиальные клетки молочной железы, экспрессирующие рецепторы стероидных гормонов в существенном количестве, регулируются ими. Клетки опухолей, с низким содержанием этих рецепторов, перестают опознаваться циркулирующими гормонами как клетки-мишени, что приводит к утрате эндокринного контроля и нарастанию автономности. Количество рецепторов в клетках рака молочной железы может служить индикатором

гормоночувствительности и указывать на возможность регрессии опухоли в ответ на гормональное лечение.

В молекулярных механизмах возникновения трансформированной клетки значимую роль выполняют онкогены и гены опухолевой супрессии. Оценка вклада отдельных генов в формирование индивидуальной предрасположенности организма женщины к развитию РЖМ в настоящее время является сложной задачей. Один из способов состоит в установлении ассоциации между признаком (фенотипом) заболевания и генетическим маркером гена-кандидата. В настоящей работе в качестве гена-кандидата рассмотрен ген, кодирующий белок-супрессор опухолевого роста (*p53*), который участвует в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптозе [Ghosh *et al.*, 2004]. Используя данные литературы и компьютерных баз, нами были выбраны полиморфизмы из различных областей гена *p53*, потенциально способные влиять на разные этапы экспрессии. Четыре полиморфных маркера *p53*, расположены: в относительной близости от P1`-промотора, C→G; в интроне 3 на расстоянии 32 п.н. от сайта сплайсинга, дупликация 16 п.н. (-ACCTGGAGGGCTGGGG-); в экзоне 4, G→C (Arg72Pro в пролин-богатом домене белка); в 3`-фланкирующей области на расстоянии ~1500 п.н. от стоп кодона *p53*, C→T.

Материалы и методы

Неоднородность выборки пациентов РМЖ по клинико-гистологическим характеристикам опухолей предполагает необходимость группирования больных в соответствии с какой-либо особенностью патологического фенотипа. Исходя из общих сведений о клинических формах болезни и гистологических типах опухолей, размере и данных о гормональном статусе опухоли (НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН), была сформирована когорта пациентов с узловым инфильтрирующим внутримолочковым раком (УИВР) молочной железы размером 182 человека. Образцы ДНК получали из крови женщин, больных УИВР молочной железы г. Томска.

Образцы ДНК больных УИВР были разделены на подгруппы в зависимости от рецепторного статуса опухоли: рецептор-позитивные и рецептор-негативные. По рецепторам к эстрогену - «ER+» и «ER-», по рецепторам к прогестерону - «PR+» и «PR-».

Подгруппы больных УИВР по рецепторному статусу к каждому гормону сравнивались между собой по частотам аллелей и генотипов всех исследуемых полиморфизмов *p53*. В качестве контрольной выборки были взяты образцы ДНК европеоидных женщин г. Новосибирска, обследованных в ходе эпидемиологической программы ВОЗ "МОНИКА". Выделение геномной ДНК из крови осуществляли экстракцией фенолом/хлороформом по стандартной методике [Sambrook *et al.*, 1989].

Генотипирование образцов ДНК по всем полиморфизмам проводили с помощью ПЦР и ПДРФ-анализа. Сравнение частот аллелей и генотипов между выборками проводили по критерию χ^2 . Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Оценка частот аллелей и генотипов по четырем полиморфизмам гена *p53* в подвыборках больных УИВР с опухолями, различающимися рецепторным статусом к стероидным гормонам, показала достоверное увеличение частоты гомозигот T/T по полиморфизму C→T в 3`-фланкирующей области *p53* до 25,6% в группе больных УИВР с «ER-» статусом по сравнению с 11,2% у пациентов с «ER+» статусом опухоли ($P_{\chi^2}=0,031$; $P_F=0,043$). Аналогичная картина обнаружена при сравнении подгрупп больных УИВР с «PR+» и «PR-» статусами опухоли. Отмечается достоверное увеличение частоты гомозигот T/T полиморфизма C→T в 3`-фланкирующей области гена *p53* в группе больных с «PR-» статусом (27,3%) по сравнению с выборкой пациентов с «PR+» статусом (8,3%) опухоли ($P_{\chi^2}=0,003$; $P_F=0,004$). Различий по частотам вариантов аллелей исследуемого полиморфизма между подгруппами

пациентов выявлено не было. По остальным трем полиморфизмам гена *p53*, в том числе по ОНП в экзоне 4, приводящему к несинонимичной замене аминокислоты в белке, достоверных отличий по частотам аллелей и генотипов между подвыборками больных УИВР молочной железы не обнаружено.

Ранее McGuire (1975 г.) показал, что чувствительность РМЖ к воздействию эстрогенов и антиэстрогенов коррелирует с количественным содержанием рецепторов в опухоли. Прогностическое значение эстроген-рецепторного статуса опухоли объясняется его корреляцией с факторами, определяющими благоприятный прогноз, такими как низкий пролиферативный индекс, гистологические особенности опухоли и т.д.

Полиморфизм $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* расположен на расстоянии около 1500 п.н. от стоп-кодона трансляции *p53*. Потенциально он может влиять на события посттранскрипционной модификации мРНК гена *p53*. Учитывая данные о низкой степени дифференцировки клеток опухолевой ткани и более злокачественном характере течения РМЖ у больных с низким содержанием рецепторов «ER» и/или «PR», можно предположить, что выявленное нами повышение частоты гомозигот *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* в группах больных с «ER-» статусом и/или «PR-» статусом, свидетельствует об ассоциации данного генотипа с более злокачественным течением заболевания. Это указывает на сомнительность положительного эффекта при попытках эндокринной коррекции в ходе лечения онкологического заболевания. Женщины с генотипом *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* потенциально могут составлять группу риска с более злокачественным течением РМЖ. Данные ассоциативного анализа указывают не только на гормонозависимую значимость 3'-фланкирующей области гена *p53* при формировании патологического фенотипа, но и на необходимость учета генотипа по данному полиморфизму при терапии больных гормональными препаратами.

Выводы

Таким образом, женщины с генотипом *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* потенциально могут составлять группу риска с более злокачественным течением РМЖ. Данные ассоциативного анализа указывают не только на гормонозависимую значимость 3'-фланкирующей области гена *p53* при формировании патологического фенотипа, но и на необходимость учета генотипа по данному полиморфизму при терапии больных гормональными препаратами.

Литература

1. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. Regulation of human *p53* activity and cell localization by alternative splicing // *Mol. and Cell. Biology.* - 2004. - P. 7987-7997.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.// Cold Spring Harbor Lab. Press. - 1989.

Резюме

Выявлено статистически достоверное увеличение частоты гомозигот *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* в группе больных УИВР с «ER - » и/или «PR-» статусом опухоли по сравнению с выборкой пациентов с «ER+» и/или «PR+» статусом ($P_{\chi^2}=0,031$ и $0,003$ соответственно).

Statistically significant increasing in *T/T* homozygotes frequency for *C/T* polymorphism located in *p53* gene 3'-flanked region in two IDC patients groups with «ER - » and/or «PR-» tumor status compared to «ER+» and/or «PR+» status patients was detected ($P_{\chi^2}=0,031$ and $0,003$, respectively).