На правах рукописи

БАКАНОВА МАРИНА ЛЕОНИДОВНА

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кемерово – 2020

Работа выполнена в лаборатории цитогенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент **Минина Варвара Ивановна**

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук **Ингель Фаина Исааковна**
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, ведущий научный сотрудник отдела профилактической токсикологии и медико-биологических исследований
доктор биологических наук, доцент **Лавряшина Мария Борисовна**
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет», профессор кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии медико-профилактического факультета

Ведущая организация:
Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Защита диссертации состоится «____»_____20_____г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.16 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.
С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; и на сайте www.rsmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20____г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
доцент **Ларина Вера Николаевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Распространенной онкопатологией, являющейся ведущей причиной смертности от злокачественных новообразований, является рак легкого (РЛ) (Ларин и др., 2017; Ferlay et al., 2019; Каприн, 2019). Различные гистопатологические, клинические характеристики РЛ, а также отличия в этиологии подтипов РЛ, свидетельствуют о гетерогенности и требуют индивидуального подхода в его исследованиях (De Sousa, Carvalho 2018). Малоизученным, но в то же время распространенным типом РЛ является аденокарцинома легкого (АКЛ) (Nakamura, Saji, 2014; Sivakumar et al., 2019).

К настоящему времени накоплен большой объем информации по опухолевым маркерам АКЛ, многие из которых уже являются частью диагностического и терапевтического обследования пациентов больных АКЛ. Показано, что полиморфный вариант гена, кодирующего теломеразу обратной транскриптазы (*TERT (rs2736100 G>T))*, характеризуется повышенной экспрессией мРНК. Отмечается также, что *rs2736100* ассоциируется с мутацией в гене рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR)* у больных немелкоклеточным РЛ (Wei et al., 2015). Особенности же нетрансформированных клеток онкологических больных изучены слабо. Немногочисленные результаты цитогенетического анализа хромосомных аберраций (ХА) в лимфоцитах крови больных солидными опухолями указывают на высокий уровень генотоксической нагрузки (Исламов и др., 2015; Vodenkova et al., 2015). Гетерогенность при формировании ХА позволяет судить о наследственно обусловленной чувствительности к действию мутагенов, возможно, связанной с унаследованными вариантами генов, контролирующих защитные механизмы или процессы злокачественной трансформации в организме (степень прогрессии опухоли, метастазирование, выход опухолевых клеток в кровоток). В литературе есть сведения о возможности использования вариантов генов ферментов

биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, контроля клеточного цикл и апоптоза в качестве маркеров риска цитогенетических нарушений (Vodicka et al., 2004, Litviakov et al., 2010, Skjelbred et al., 2011, Akbaş et al., 2012, Hemminki et al., 2015). Кроме того, установлено, что некоторые полиморфные варианты этих генов являются значимыми в онкогенезе. Данные об ассоциациях РЛ с полиморфными вариантами генов ферментов защитных систем организма довольно многочисленны, противоречивы, своеобразны для каждой популяции, что свидетельствуют о необходимости верификации результатов.

Неоднозначным и интенсивно изучаемым феноменом является также биология теломер (Xu et al., 2013; Stanley et al., 2016). Предполагается, что поддержание длины теломер необходимо для обеспечения стабильности генома и защиты от злокачественной трансформации. Результаты исследований длины теломер у больных различными формами рака пока противоречивы. Некоторые исследователи демонстрируют увеличение риска онкопатологий в связи с укорочением теломер (Ma et al., 2011; Wentzensen et al., 2011), тогда как другие выявили противоположные ассоциации (Zhang et al., 2015; McNally et al., 2019) или их отсутствие (Pooley et al., 2010).

Таким образом, становятся актуальными исследования особенностей накопления хромосомных повреждений, изменения длины теломер в нетрансформированных клетках онкобольных, в комбинации с анализом унаследованных полиморфных вариантов генов, потенциально способных модифицировать индивидуальную чувствительность и риск АКЛ.

Цель исследования: изучение спектра генетических вариантов в генах, кодирующих ферменты биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, контроля клеточного цикл и апоптоза, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB, теломеразной обратной транскриптазы, а также хромосомной нестабильности и длины теломер в

клетках периферической крови у больных аденокарциномой легкого в условиях действия триггерных факторов среды.

Задачи исследования:

1. Выполнить сравнительный анализ полиморфных локусов генов ферментов репарации ДНК (*hOGG1 (rs1052133 C>G), PARP1 (rs1136410 T>C), APEX1 (rs1130409 T>G), XPD (rs13181 T>G))*, биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1 (rs4646903T>C), CYP1A2 (rs762551-163 C>A), GSTM1 (del), GSTT1 (del))*, контроля клеточного цикл и апоптоза (*TP53 (rs1042522 G>C))*, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB (*EGFR* (*2227984 A>T*)), теломеразной обратной транскриптазы (*TERT(rs2736100 G>T))* в группах больных аденокарциномой легкого и здоровых жителей.
2. Выявить генетические локусы, ассоциированные с развитием аденокарциномы легкого с учетом курения и контакта с производственными токсикантами.
3. Исследовать взаимосвязь полиморфных вариантов генов-кандидатов с развитием аденокарциномы легкого с учетом характеристики злокачественного новообразования (TNM-классификация, локализация опухоли, метастазирование), возраста манифестации заболевания и полового диморфизма.
4. Сопоставить уровень и спектр хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови у больных аденокарциномой легкого и здоровых жителей. Провести анализ ассоциаций исследованных генов-кандидатов с хромосомными аберрациями в клетках крови в изученных группах.
5. На основе изученных моделей взаимодействий генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1 (rs4646903 T>C), CYP1A2 (rs762551 -163C>A), GSTM1 (del), GSTT1 (del))*, репарации ДНК (*hOGG1 (rs1052133 C>G), PARP1 (rs1136410 T>C), APEX1 (rs1130409 T>G), XPD (rs13181 T>G))*, контроля клеточного цикл и апоптоза (*TP53 (rs1042522 G>C))*, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ

ErbB (*EGFR* (*rs2227984 A>T*)), теломеразной обратной транскриптазы (*TERT (rs2736100 G>T))* оценить значимость ключевых генов в формировании наследственной предрасположенности к хромосомной нестабильности и развитию аденокарциномы легкого.

6. Провести анализ ассоциации длины теломерных повторов с формированием аденокарциномы легкого.

Научная новизна работы. Впервые получены данные о частотах аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов *CYP1A1 rs4646903, CYP1A2 rs762551, GSTM1 (del), GSTT1 (del), hOGG1 rs1052133, PARP1 rs1136410, APEX1 rs1130409, XPD rs13181, TP53 rs1042522, EGFR rs2227984, TERT rs2736100* в этнической группе русских больных аденокарциномой легкого, проживающих в Кемеровской области.

Впервые установлена ассоциация полиморфного варианта гена *XPD (ERCC2) rs13181* с развитием аденокарциномы легкого. Определены значимые ген-средовые взаимодействия: с курением - для локусов *XPD(ERCC2) rs13181, CYP1A1 rs4646903, EGFR rs2227984;* с производственным стажем - для *XPD(ERCC2) rs13181; CYP1A1 rs4646903*.

Выявлены генетические маркеры повышенного риска манифестации аденокарциномы легкого в зрелом возрасте - *XPD (ERCC2) rs13181;* в пожилом возрасте - *GSTT1 (del);* у мужчин - *XPD (ERCC2) rs13181;* у женщин – *CYP1A1 rs4646903;* на поздних стадиях (III-IV) заболевания; у больных с метастазами - *XPD (ERCC2) rs13181*.

В культуре лимфоцитов периферической крови больных аденокарциномой легкого было обнаружено накопление повреждений хромосом выше фонового регионального уровня (повышена частота аберраций хромосомного и хроматидного типов) и впервые зарегистрирован феномен rogue cells (клетки с множественными аберрациями хромосомного типа).

Впервые проведен анализ роли межгенных взаимодействий при формировании наследственной предрасположенности к аденокарциноме

легкого и формировании высокого уровня хромосомных аберраций. Получены информативные модели межгенных взаимодействий: *XPD (rs13181 T>G) - EGFR (rs2227984 A>T) - TP53 (rs1042522 G>C); CYP1A2 (rs762551 C>A) - GSTM1(del) - GSTT1(del).*

Впервые произведено определение относительной длины теломер в лейкоцитах периферической крови у жителей Западной Сибири, больных аденокарциномой легкого.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы расширяют фундаментальные представления о молекулярно-генетических основах патогенеза АКЛ, приближают к пониманию предрасположенности к формированию хромосомных аберраций у больных АКЛ. Полученные сведения целесообразно использовать при создании профилактических программ с учетом индивидуальных особенностей, а также в учебном процессе на биологических и медицинских факультетах ВУЗов и на курсах последипломного образования.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в практическую деятельность ГБУЗ КО Кемеровского клинического консультативно-диагностического центра г.Кемерово (ГБУЗ КО КККДЦ) и ГБУЗ КО «Областного клинического онкологического диспансера» (ГБУЗ КО ОКОД).

Методология и методы исследования. В исследовании был использован системный подход, включающий в себя как специальные, так и общенаучные методы. С помощью специальных методов проведен анализ результатов исследований ведущих отечественных и зарубежных ученых по теме диссертации, изучены данные медицинской документации, специальные анкеты больных РЛ и жителей Кемеровской области из группы сравнения, осуществлены лабораторные методы (забор и первичная обработка биологического материала, методы молекулярной генетики, цитогенетический анализ), произведена регистрация полученной информации и статистическая обработка данных. Из общенаучных методов

применялись эмпирические (сравнение), теоретические (формализация, гипотетико-дедуктивный метод, восхождение от абстрактного к конкретному) и общелогические методы исследования (анализ, синтез, абстрагирование, обобщение, индукция, дедукция, системный подход, вероятностно-статистические методы).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. С формированием аденокарциномы легкого ассоциированы полиморфные варианты генов *CYP1A1 (rs4646903), XPD (rs13181), EGFR* (*rs2227984*), *GSTT1 (del)*. Спектр выявленных маркеров наследственной предрасположенности варьирует в зависимости от полового диморфизма (у мужчин - *XPD rs13181;* у женщин – *CYP1A1 rs4646903)*, возраста (*XPD (rs13181)*– у пациентов зрелого возраста, *GSTT1 (del)* - у пациентов пожилого возраста), статуса курения (*XPD rs13181, CYP1A1 rs4646903, EGFR rs2227984* – у курящих), наличия контакта с производственными токсикантами (*XPD rs13181; CYP1A1 rs4646903*).
2. В лимфоцитах периферической крови больных аденокарциномой легкого наблюдается повышенный уровень повреждений хромосом, как хроматидного (1,94±0,13% против 1,04±0,06%; p=0,000001), так и хромосомного типов (1,31±0,14% против 0,51±0,05; p=0,000001). Наследственная предрасположенность к накоплению хромосомных аберраций в клетках крови у больных связана с вариантами генов: *CYP1A2* (*rs762551), XPD (rs13181), TP53 (rs1042522).*
3. Характер межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1 (rs4646903), CYP1A2 (rs762551), GSTM1 (del), GSTT1 (del))*, репарации ДНК (*hOGG1 (rs1052133), PARP1 (rs1136410), APEX1 (rs1130409), XPD (rs13181))*, контроля клеточного цикл и апоптоза (*TP53 (rs1042522)*, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB (*EGFR* (*rs2227984*), теломеразной обратной транскриптазы (*TERT (rs2736100)* при формировании хромосомных

аберраций и развитии аденокарциномы легкого варьирует в зависимости от полового диморфизма и статуса курения.

4. Увеличение относительной длины теломерных повторов ассоциировано с аденокарциномой легкого.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается детальным подходом к выбору темы и методов исследования путем анализа большого количества отечественной и зарубежной литературы. Эксперименты были проведены на современном сертифицированном оборудовании. Для обработки данных и подтверждения достоверности полученных результатов использовались современные пакеты статистических программ.

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены VII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2019), IV Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2018, 2019), Всероссийской конференции по молекулярной онкологии «Успехи молекулярной онкологии» (Москва, 2017, 2018), Ежегодной конференции молодых ученых ФИЦ УУХ СО РАН «РАЗВИТИЕ» (Кемерово, 2018), Международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева «Беляевские чтения» (Новосибирск, 2017), научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2017, 2019), Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2016, 2019), конференции «Петровские чтения» (Санкт-Петербург, 2013), Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2011» (Москва, 2011), Инновационном конвенте «КУЗБАСС: ОБРАЗОВАНИЕ, НАУКА, ИННОВАЦИИ» (Кемерово, 2012, 2013, 2016), Научной сессии ИЭЧ СО РАН (Кемерово. 2010, 2011, 2012, 2013), Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием (Кемерово, 2010, 2013).

Личный вклад автора. Все ступени при подготовке диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автором детально

изучена и проработана отечественная и зарубежная литература, определены цели и задачи исследования. Автор принял участие в проведении молекулярно-генетических и цитогенетических исследований, в подготовке всех публикаций по диссертационной теме. Автор лично осуществил анализ анкетных данных, данных медицинской документации, статистическую обработку данных с последующей интерпретацией и формулированием выводов, а также написал и оформил данную рукопись.

Публикации. По теме исследования опубликовано 8 печатных работ в журналах, входящих в список ВАК Минобрнауки РФ для соискателей ученой степени кандидата наук, из которых 5 статей — в журналах, индексируемых в базах Web of Science или Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 249 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 33 рисунками. Список литературы включает 488 источников, из них 461 иностранный автор.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация «Изучение молекулярно-генетических и цитогенетических факторов риска развития аденокарциномы легкого» соответствует паспорту специальности «03.02.07 – Генетика (биологические науки)». В работе исследован вклад полиморфных вариантов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК, контроля клеточного цикл и апоптоза, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB, теломеразной обратной транскриптазы в формирование риска развития АКЛ, и повреждения хромосом у больных АКЛ, что соответствует формуле специальности и пунктам 1, 3, 4, 7, 17 области исследований.

Финансовая поддержка работы. Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания № ГЗ 0352-2019-0011 (ЕГИСУ НИОКР АААА-А17-117041410052-4).

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность за помощь в проведении совместных исследований и обсуждении полученных результатов коллегам Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН, специалистам ГБУЗ КО «Областного клинического онкологического диспансера» и Кемеровского областного центра крови.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Было проведено исследование по типу «случай-контроль» одобренное этическим комитетом Института экологии человека СО РАН (Протокол № 3 от «20» февраля 2015). В группу пациентов с диагнозом АКЛ были включены 304 человека (Таблицы 1-2), проживающих на территории Кемеровской области и проходящих лечение в Областном клиническом онкологическом диспансере.

Таблица 1. Характеристика группы больных аденокарциномой легкого

Характеристики		Частота, %
Стадия заболевания	I/II	48.4
	III/IV	51.6
Наличие метастазов	Метастазы имеются	58.2
	Метастазы отсутствуют	41.8
Пораженное легкое	Правое	59.3
	Левое	40.7
Локализация опухоли	Периферическое расположение	88.3
	Центральное расположение	11.7
Локализация опухоли в долях легкого	Верхняя	61.7
	Нижняя+средняя	38.3

Контрольная группа была сформирована из 366 доноров Кемеровского областного центра крови. Отбор индивидов в контрольную группу проводился после их предварительного анкетирования с помощью специально разработанного опросника (Таблица 2).

Материалом исследования послужила цельная периферическая кровь, забиравшаяся из локтевой вены в асептических условиях с использованием разовых вакуумных систем (пробирки «Вакутейнер»). Для постановки клеточных культур кровь распределялась в пробирку с Na-гепарином, а для выделения образцов геномной ДНК в пробирку с К2-ЭДТА. Образцы крови транспортировали в лабораторию цитогенетически Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН в термоконтейнере (+4 °С).

Таблица 2. Характеристика обследованных групп

Характеристики групп	Больные РЛ (N)	Группа сравнения (N)
Всего обследовано	304	366
Мужчины / женщины	213/ 91	295/ 71
Возраст, лет	59.8	54.9
Курящие	186	157
Некурящие	118	209
Производственный риск (есть/нет)	166/138	129/237
Средний стаж работы на “вредном” производстве, лет	20.4	19.4

Молекулярно-генетические методы. Для анализа полиморфных локусов выделяли геномную ДНК из периферической крови с помощью метода фенол–хлороформной экстракции.

Генотипирование полиморфных вариантов *CYP1A1 (rs4646903)*, *CYP1A2 (rs762551), TP53 (rs1042522),TERT(rs2736100)* было выполнено методом real-time ПЦР с конкурирующими TaqMan-зондами (СибДНК, Новосибирск). Анализ полиморфных вариантов генов *APEX1 (rs1130409)*, *hOGG1 (rs1052133), PARP1 (rs1136410), XPD (rs13181)*, *EGFR (rs2227984)* определяли методом аллель-специфической ПЦР с использованием наборов «SNP-экспресс» (НПФ «Литех», г. Москва). Делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* анализировали в режиме реального времени с использованием

интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I (ООО «СибДНК», г. Новосибирск).

Анализ длины теломерных повторов выполнялся при помощи количественной полимеразной реакции (Q-PCR) в реальном времени на амплификаторе CFX96 Real-Time System с применением интеркалирующего красителя SYBR Green Supermix («BioRad», США). Праймеры были синтезированы ООО "ДНК-Синтез" (г. Москва).

Цитогенетический анализ. Культивирование клеток крови осуществляли по стандартному полумикрометоду (Hungerford, 1965). Подготовка препаратов хромосом, отбор метафаз, включаемых в анализ, и критерии для регистрации цитогенетических нарушений соответствовали общепринятым рекомендациям (Бочков и др., 2001).

Статистическая обработка результатов исследования Математическую обработку материала проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 10.0» (StatSoft, Inc., USA). Сравнение частот аллелей и генотипов генов проводили с помощью четырехпольной таблицы сопряженности с поправкой Йетса на непрерывность вариации (χ^2). Нулевую гипотезу отвергали при $p \leq 0,05$ (Лакин, 1990). С помощью https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl оценивали соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга (pHWE). Взаимосвязи полиморфных локусов в аддитивной, доминантной, сверхдоминантой, рецессивной, лог-аддитивной моделях выявляли с помощью SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats) и логистической регрессии. Для выбора модели использовали информационный критерий Акайке (AIC). Гипотезу о существенности построенной модели с учетом всех переменных проверяли на основании теста отношения правдоподобия и его значимости P_{adj}. Для исключения ошибки первого типа использовали поправку на множественность сравнений (поправка Бонферрони (Bonferroni)).

Для цитогенетических показателей и относительной длины теломер рассчитывали медианы (Me), размах (min-max), средние значения (M), их

стандартные ошибки (m), выборочное стандартное отклонение (STD). Для парных сравнений применяли U-тест Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test), а при сопоставлении трех и более групп использовали ранговый критерий Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis H-test). Цитогенетические эффекты и средняя длина теломер, ассоциированные с риском развития АКЛ, были изучены с помощью бинарной логистической регрессионной модели. Экспоненту коэффициента регрессии, интерпретировали как отношение шансов (OR_{adj}). Для OR_{adj} рассчитывали доверительный интервал (CI) при 95% уровне значимости.

Пороговые значения уровня повреждений ДНК были рассчитаны, при помощи ROC-анализа (Zweig, Campbell, 1993). Анализ межгенных взаимодействий позволил оценить все возможные 2n (двухлокусные), 3n (трехлокусные), 4n (четырехлокусные) модели комбинаций SNP методом Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) (Moore et al, 2006; http://www.multifactordimensionalityreduction.org/).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Приоритизация генов, ассоциированных с аденокарциномой легкого

При помощи программы ANDSystem была проведена приоритизация генов, вовлеченных в формирования риска развития АКЛ. Данные для исследования, аннотированные как АКЛ, были отобраны из базы данных «LUNG CANCER EXPLORER» (http://qbrc.swmed.edu/lce/). В результате получена генная сеть, состоящая из генов, белков и их взаимодействий, из которой следующие гены были использованы в качестве кандидатов для дальнейшего анализа: гены ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*CYP1A1 (rs4646903T>C), CYP1A2 (rs762551-163 C>A), GSTM1 (del), GSTT1 (del))*, репарации ДНК (*hOGG1 (rs1052133 C>G), PARP1 (rs1136410 T>C), APEX1 (rs1130409 T>G), XPD (rs13181 T>G))*, контроля клеточного цикл и апоптоза (*TP53 (rs1042522 G>C))*, трансмембранного рецептора семейства

рецепторных тирозинкиназ ErbB (*EGFR* (*rs 2227984 A> T*)), теломеразной обратной транскриптазы (*TERT(rs2736100 G>T)).*

Полиморфные варианты генов ферментов репарации ДНК, биотрансформации ксенобиотиков, контроля клеточного цикл и апоптоза, трансмембранного рецептора семейства рецепторных тирозинкиназ ErbB, теломеразной обратной транскриптазы в исследуемых группах

Анализ распределения частот аллелей и генотипов изученных генов в группе пациентов Областного онкологического диспансера с диагнозом АКЛ и в группе здоровых доноров, жителей Кемеровской области близкого возраста и пола, которые составили группу сравнения (ГС) показал соответствие равновесию Харди-Вайнберга в ГС. У больных АКЛ распределение генотипов и аллелей соответствовало равновесию Харди-Вайнберга для всех изученных генов, кроме *hOGG1 (rs1052133 C>G)*, и в дальнейшем из анализа данный локус был исключен.

При сравнении частот полиморфных вариантов генов ферментов репарации ДНК больных АКЛ с группой здоровых жителей было выявлено различие частот встречаемости аллелей и генотипов гена *XPD (rs13181 T>G)*. Наиболее значимо ассоциация проявлялась в доминантной модели наследования (OR_{adj}=1,82; 95% CI:1,27-2,59; p_{adj}=0,00009, AIC 786; p_{cor}=0,001). Распределение полиморфизма гена *XPD Lys751Gln* у больных АКЛ отличалась от здоровых в доминантной модели наследования для мужчин (OR_{adj} = 1,99; 95% CI:1,33-2,98, p_{adj} =0,00008; p_{cor}=0,0009), курящих (OR_{adj}=2,05; 95% CI:1,29-3,26, p_{adj}=0,002; p_{cor}=0,02), пациентов зрелого возраста (OR_{adj}=1,95; 95% CI:1,28-2,95, p_{adj}=0,002; p_{cor}=0,02); лог-аддитивной модели наследования для лиц, имеющих контакт с генотоксикантами на производстве (OR_{adj}=1,93; 95% CI:1,25-2,98, p_{adj}=0,003; p_{cor}=0,03), для больных на III-IV стадии заболевания (OR_{adj}=1,69; 95% CI:1,26-2,26; p_{adj}=0,00004, AIC 552,4; p_{cor}=0,0004), с метастазами (OR_{adj}=1,53; 95% CI:1,16-

2,01; p_{adj}=0,003, AIC 600,5; p_{cor}=0,03), с опухолью на верхней доле легкого (OR_{adj}=1,57; 95% CI:1,18-2,10; p_{adj}=0,0019, AIC 574; p_{cor}=0,02).

Установлена значимая кодоминантная модель наследования гена *CYP1A1 (rs4646903 T>C)* у больных АКЛ женщин (OR_{adj}=0,19; 95% CI:0,06-0,62; p_{adj}=0,003, AIC 187,9; p_{cor}=0,03), сверхдоминантная - у курящих (OR_{adj}=0,34; 95% CI:0,17-0,70; p_{adj}=0,002, AIC 440,5; p_{cor}=0,02), имеющих стаж работы на вредном производстве (OR_{adj}=0,13; 95% CI:0,06-0,31; p_{adj}=0,0001, AIC 295,5; p_{cor}=0,001). Кроме того, при сравнении пожилых больных АКЛ и здоровых доноров получены статистически значимые отличия частоты делеции гена *GSTT1(del)* (OR_{adj}=4,25; 95% CI:1,78-10,14; p_{adj}=0,00004, AIC 192,9; p_{cor}=0,004).

Статистически значимая ассоциация была выявлена для локуса *EGFR 2073 A>T (rs2227984)* в рецессивной модели наследования (OR_{adj}=2,67; 95% CI:1,50-4,76; p_{adj}= 0,00005, AIC 465; p_{cor}=0,001) у курящих.

Анализ межгенных взаимодействий при формировании риска развития аденокарциномы легкого у населения Кемеровской области

С помощью метода MDR (Moore et al, 2006) выявлена статистически значимая трехлокусная модель в группе больных АКЛ, которая включала в себя тесное взаимодействие между полиморфными локусами *EGFR (A2073T)* и *TP53 (G215C).* Вклад локуса *XPD (T2251G)*, дублировался с эффектами данного кластера и был наибольшим (H (энтропия) = 5,39%) (CVC-10/10; Pre=0,8099; p<0,0001).

Для мужчин обнаружена модель ген-генного взаимодействия, которая представляла собой кластер взаимодействия локусов *XPD (T2251G)* и *TERT (-2203 G>T)* с дублирующим эффектом на риск развития АКЛ, и независимым эффектом локуса *EGFR (A2073T)* (CVC - 10/10; Pre =0,7527; p<0,0001). Вклад гена *XPD (T2251G)* был наибольшим (H = 5,16%).

Модель с этими же локусами с сильным взаимодействием дублирующего эффекта генов на риск развития АКЛ, была получена для

курящих (CVC -10/10; Pre=0,8974; p<0,0001). Вклад между генами *XPD (T2251G)* и *EGFR (A2073T)* был сходным. Для *XPD (T2251G)* - H = 2,46%, а для *EGFR (A2073T)* – H=2,42%.

Анализ цитогенетических нарушений в лимфоцитах крови больных аденокарциномой легкого и доноров группы сравнения

В результате проведенного цитогенетического анализа было зафиксировано, что средняя частота метафаз с ХА у больных АКЛ статистически значимо выше, чем в ГС (3,14±0.18% против 1,47±0.07%; p=0,000001; OR_{adj}=1,66; 95% CI:1,43-1,89; p_{adj}= 0,00008), аберраций как хроматидного (1,94±0,13% против 1,52±0,08 %; p=0,0000001; OR_{adj}=1,66; 95% CI:1,53-1,92; p_{adj}= 0,000105), так хромосомного типов (1,31±0,14% против 0,51±0,05%; p=0,0000001; OR_{adj}=1,35; 95% CI:1,09-1,61; p_{adj}= 0,022546). Статистически значимые отличия между больными АКЛ и группой сравнения выявлены как у мужчин (3,14±0,20% против 1,50±0,08%; p=0,000001), так и у женщин (3,11±0,49% против 1,25±0,19%; p=0,0002), как в группах зрелого возраста (3,25 ± 0,26% против 1,48 ± 0,07%; p=0,000001), так и преклонного возраста (2,98 ± 0,25% против 1,56 ± 0,27%; p=0,0002), среди тех, кто контактировал (3,20±0,23 против 1,58±0,13; p=0,000001), и не контактировал (3,03±0,31 против 1,41±0,08; p=0,000006) с мутагенами на производстве, у курящих (3,31±0,22 против 1,48±0,11; p=0,000001), и у некурящих (2,29±0,15против 1,47±0,10;p=0,0004).

Зарегистрирован феномен появления в культуре лимфоцитов больных раком легкого rogue cells (метафаз «нагруженных» аберрациями хромосомного типа) с частотой 0,007±0,005 на 100 клеток.

Ассоциации полиморфизма генов-кандидатов и аберраций хромосом у жителей Кемеровской области больных аденокарциномой легкого

Превышение частоты аберрантных метафаз зафиксировано в группе больных АКЛ с генотипами всех изученных генов по сравнению с группой

здоровых доноров. При сопоставлении частоты ХА у лиц с разными генотипами внутри исследуемых групп статистически значимые отличия получены по частоте аберраций хромосомного типа для генов *XPD 2251 T>G* (p_{cor}=0,03; OR_{adj}=1,90 95% CI:1,63-2,42; p_{adj}=0,02) и *CYP1A2-163C>A* (p_{cor}=0,03; OR_{adj}=1,31 95% CI:1,20-1,52; p_{adj}=0,01) у больных АКЛ.

У больных АКЛ мужчин чаще регистрировались аберрации хромосомного типа с генотипом *AA*, чем *CA* гена *CYP1A2 -163C>A* (1,73±0,25 против 0,82±0,12, p_{cor}=0,007; OR_{adj}=1,80 95% CI:1,43-2,18; p_{adj}=0,002). У курящих больных были найдены отличия у генотипа *AA* от *CA* гена *CYP1A2 -163C>A* по общему уровню ХА (3,88±0,33 против 2,50±0,24, p_{cor}=0,01; OR_{adj}=1,42 95% CI:1,19 -1,65; p_{adj}=0,003), и по аберрациям хромосомного типа (1,88±0,26 против 0,81±0,13, p_{cor}=0,001; OR_{adj}=2,14 95% CI:1,70-2,57; p_{adj}=0,001). Индивидуумы, имеющие контакт с генотоксикантами на производстве, характеризовались накоплением аберраций хромосомного типа для генотипов *AA* по сравнению с *CA* гена *CYP1A2 -163C>A* (1,80±0,30 против 0,74±0,14, p_{cor}=0,01; OR_{adj}=2,15 95% CI: 1,66 -2,64; p_{adj}=0,002), и *GG* по сравнению с *TT* гена *XPD 2251 T>G* (2,06±0,44 против 0,76±0,18, p_{cor}=0,02; OR_{adj}=2,44 95% CI: 1,69 -3,19; p_{adj}=0,02). Среди больных, не контактирующих с мутагенами на производстве, зафиксировано превышение уровня ХА у обладателей минорного аллеля *C* (генотипы *CC +GC* против *GG)* гена *TP53 215 G>C* (4,07±0,49 против 1,96±0,27, p_{cor}=0,01; OR_{adj}=1,51 95% CI:1,18 -1,85; p_{adj}=0,02).

Получены значимые превышения частоты парных фрагментов у больных с опухолью на нижней доле легкого (1,36±0,21 против 0,18±0,12; p_{cor}=0,01), имеющих метастазы (1,39±0,16 против 0,45±0,13; p_{cor}=0,04), аберраций хромосомного типа у больных с опухолью на нижней доле легкого (1,99±0,36 против 0,41±0,20; p_{cor}=0,02) для генотипа *GG* от *TT* гена *XPD 2251 T>G*. Кроме того, отмечается превышение общего уровня ХА у больных с АКЛ в правом легком (4,00±0,36 против 2,67±0,32; p_{cor}=0,03), с периферической АКЛ (3,56±0,30 против 2,38±0,21; p_{cor}=0,03), парных

фрагментов и аберраций хромосомного типа на 3 стадии заболевания (1,49±0,24 против 0,45±0,15; p_{cor}=0,02; 2,05±0,25 против 0,66±0,22; p_{cor}=0,01), и у больных с АКЛ в правом легком (1,37±0,18 против 0,84±0,31; p_{cor}=0,01; 1,99±0,30 против 1,14±0,32; p_{cor}=0,01) для генотипа *AA* от *CA* гена *CYP1A2 -163C>A.*

Анализ межгенных взаимодействий при формировании хромосомных аберраций у обследованных пациентов

Анализ роли межгенных взаимодействий в формировании повышенного уровня ХА у больных выявил значимую 3-х локусная модель, характеризующейся синергизмом и взаимным усилением *CYP1A2 (rs762551 C>A), GSTM1large deletion* и дублированием данного кластера локусом *GSTT1large deletion* (CVC - 10/10; Pre=0, 7465; p<0,0001). Наибольший вклад в формирование ХА у больных АКЛ имел ген *CYP1A2 (rs762551 C>A)* (H=2,74%).

Анализ относительной длины теломер в лимфоцитах крови больных аденокарциномой легкого и доноров группы сравнения

В группе больных относительная длина теломер статистически значимо превышала данный показатель у здоровых (1,95 ± 0,28 против 1,07 ± 0,09; p=0,003; OR=1,35 95% CI: 1,12-1,58), у больных АКЛ мужчин (1,93 ± 0,39 против 1,09 ± 0,09; p=0,02; OR=1,33 95% CI:1,08-1,57; p=0,02), в группе курящих (2,12 ± 0,44 против 1,06 ± 0,09; OR=1,41 95% CI:1,11-1,72; p=0,03), имеющих стаж работы на вредном производстве (2,22 ± 0,43 против 1,03 ± 0,1; OR=1,47 95% CI:1,17-1,76; p=0,01), имеющих (2,11 ± 0,44 против 1,07 ± 0,09; p=0,02) и не имеющих (1,71 ± 0,21 против 1,07 ± 0,09; p=0,02) метастазы, на ранних (I-II; 1,72 ± 0,2 против 1,07 ± 0,09; p=0,01) и поздних (III-IV; 2,10 ± 0,44 против 1,07 ± 0,09; p=0,03) стадиях. Установлено, что относительная средняя длина теломер у больных АКЛ, была больше у обладателей генотипа *G/G* по сравнению с *T/T* гена *TERT(rs2736100 G>T)*

(2,25±0,65 против 1,48±0,28), однако статистической значимости по полученным результатам достигнуто не было.

ВЫВОДЫ

1. Была выявлена ассоциация вариантов гена *XPD (rs13181 T>G)* с риском развития АКЛ (в доминантной модели наследования).

2. С формированием АКЛ у курящих установлена статистически значимая ассоциация *XPD (rs13181 T>G)* в доминантной модели наследования; *CYP1A1 (rs4646903 T>C)* в сверхдоминантной модели наследования; *EGFR 2073A>T (rs2227984)* в рецессивной модели наследования. У больных АКЛ, имевших контакт с генотоксикантами на производстве, получена значимая лог-аддитивная модель наследования гена *XPD (rs13181 T>G)*, а также обнаружены ассоциация с *CYP1A1 (rs4646903 T>C)* для сверхдоминантной модели наследования.

3. Спектр выявленных маркеров наследственной предрасположенности варьирует у мужчин (*XPD rs13181;* доминантная модель наследования) и женщин (*CYP1A1 rs4646903;* кодоминантная модель наследования). Причем, ассоциация АКЛ с лог-аддитивной моделью наследования *XPD (rs13181 T>G)* получена у пациентов с III-IV стадией заболевания и с метастазами. При сравнении больных АКЛ и здоровых доноров в разных возрастных группах в группе зрелого возраста установлена статистически значимая ассоциация с *XPD (rs13181 T>G)* (доминантная модель наследования). В то время как в группе пожилых пациентов была выявлена ассоциация с *GSTT1(del)*.

4. В ходе цитогенетического анализа установлено, что частота метафаз с ХА в клетках крови больных АКЛ была выше, чем в группе сравнения. Отмечено повышение частоты встречаемости одиночных, парных фрагментов, дицентрических хромосомы с фрагментами. У больных АКЛ были зарегистрированы rogue cells.

5. Анализ цитогенетических показателей в зависимости от генотипов изученных генов показал статистически значимые отличия по аберрациям хромосомного типа для генотипов *GG* от *TT* гена *XPD 2251 T>G* и *AA* от *CA* гена *CYP1A2 -163C>A* у больных АКЛ, по аберрациям хромосомного типа для генотипа *AA* от *CA* гена *CYP1A2 -163C>A* у больных АКЛ мужчин. У курящих больных были найдены отличия для генотипа *AA* от *CA* гена *CYP1A2 -163C>A* по общему уровню ХА, и по аберрациям хромосомного типа.

Индивидуумы, имевшие контакт с генотоксикантами на производстве, характеризовались накоплением аберраций хромосомного типа для генотипа *AA* от *CA* гена *CYP1A2 -163C>A*, и *GG* от *TT XPD 2251 T>G*. Среди больных, не контактирующих с мутагенами на производстве, зафиксировано превышение уровня ХА у обладателей минорного аллеля *C* гена *TP53 215 G>C*.

6. Анализ межгенных взаимодействий при формировании АКЛ позволили выявить статистически значимые модели в общей группе (*XPD (T2251G), EGFR (A2073T), TP53 (G215C);* p<0,0001), у мужчин (*XPD (T2251G), TERT (1574-3777 G>T), EGFR (A2073T)*; p<0,0001); у курящих (*XPD (T2251G), TERT (1574-3777 G>T), EGFR (A2073T)*; p<0,0001). Анализ структуры межгенных взаимодействий при формировании ХА у больных АКЛ позволил выявить статистически значимую трехлокусную модель, которая включала в себя *CYP1A2 (rs762551 C>A), GSTM1 (del), GSTT1(del)* (p<0,0001).

7. Установлено, что у больных АКЛ относительная длина теломерных повторов больше, чем у здоровых.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для раннего прогнозирования риска развития аденокарциномы легкого рекомендуется проводить молекулярно-генетический анализ полиморфных локусов *XPD rs13181, EGFR rs2227984, TP53 rs1042522* - у всех

обследуемых; *XPD rs13181, EGFR rs2227984, TERT rs2736100* – у мужчин; *CYP1A1 rs4646903* – у женщин; *XPD rs13181, CYP1A1 rs4646903, TERT rs2736100, EGFR rs2227984* – у курящих; *XPD rs13181* – у обследуемых зрелого возраста; *GSTT1(del)* – у обследуемых пожилого возраста; *XPD rs13181, CYP1A1 rs4646903* – у обследуемых, имеющих контакт с генотоксикантами на производстве.

2. Оценка спонтанного уровня хромосомных аберраций и измерение длины теломерных повторов в лимфоцитах крови может быть рекомендовано всем обследуемым в системе мер по выявлению повышенной канцерогенной опасности.
3. Для определения риска хромосомных нарушений рекомендуется проводить исследование полиморфных локусов *XPD rs13181, CYP1A2 rs762551, GSTM1 (del), GSTT1 (del)* - у всех обследуемых; *CYP1A2 rs762551* – у мужчин и курящих; *CYP1A2 rs762551, XPD rs13181* – у обследуемых, имеющих контакт с генотоксикантами на производстве; *TP53 rs1042522*– у обследуемых, не имеющих контакт с генотоксикантами на производстве.
4. При выявлении высокого риска развития аденокарциномы легкого по результатам обследования показано проведение регулярного углубленного медицинского обследования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Учитывая тот факт, что в настоящем исследовании были обследованы преимущественно мужчины (70%), для получения более полной картины о спектре мутаций при АКЛ целесообразно расширение выборки за счет женщин больных АКЛ, курящих, имеющих контакт с генотоксичными канцерогенами (среди обследованных нами женщин имеют стаж работы на вредном производстве – 27%, а курящих – 13%).

Дальнейшее изучение взаимосвязи ХА с полиморфными вариантами генов, контролирующими защитные механизмы организма, также требует анализа значительно большей выборки пациентов (среди обследованных

нами цитогенетический анализ был проведен у 50% больных АКЛ). Углубление представлений о причинах возникновения, возможной биологической роли и практической значимости цитогенетического феномена rogue cells (клетки с множественными аберрациями хромосомного типа). С учетом имеющихся к настоящему времени гипотез оценить роль предполагаемых причин возникновения данных клеток (инфекционные факторы, радиационное воздействие, процессы малигнизации в организме др.), провести идентификацию в rogue лимфоцитах каждой отдельной хромосомы и её фрагментов.

Для понимания специфики выявленной взаимосвязи между АКЛ и длиной теломер необходимо увеличение объема выборки, дифференциация групп в зависимости от множества потенциальных конфаундеров.

Разработка алгоритма персонализированных подходов профилактических мероприятий АКЛ у индивидуумов, обладающих повышенной чувствительностью к канцерогенам.

Учитывая гетерогенный характер опухоли легкого, возникает необходимость обследования других гистологических групп РЛ (крупноклеточный, мелкоклеточный и др.)

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Баканова, М.Л.** Ассоциации полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков и рака легкого у человека (обзор литературы) / М.Л. Баканова, В.И. Минина, Я.А. Савченко // Медицинская генетика. – 2012. -№11 – С.13-21.

2. **Баканова, М.Л.** Ассоциации полиморфных вариантов генов репарации ДНК и хромосомных аберраций у больных раком легкого / М.Л. Баканова, В.И. Минина, Я.А. Савченко, А.А. Тимофеева, О.А. Дудкина, В.И. Титов Н.Е. Вержбицкая// Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2013. - №4. - С. 3-6.

3. **Баканова, М. Л.** Хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови у больных раком легкого, проживающих в Кемеровской области / М. Л. Баканова, В. И. Минина, Я. А. Савченко, А.В. Рыжкова, Т.А. Головина, В.А. Титов, Н.Е. Вержбицкая, И. А. Вафин, С. Е. Рагожина // Медицинская генетика. - 2014. - №4. - С.39-43**.**

4. Druzhinin, V**.** Lymphocytes with multiple chromosomal damages in a large cohort of West Siberia residents: results of long -term monitoring / V. Druzhinin, **M. Bakanova,** A. Fucic, T. Golovina, Ya. Savchenko, M. Sinitsky, V. Volobayev // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. - 2016. - V.784. - P.1–7.

5. Minina, V.I. Polymorphisms of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* genes and chromosomal aberrations in lung cancer patients / V.I. Minina, O.A. Soboleva, A.N. Glushkov, E. N. Voronina, E.A. Sokolova, **M.L. Bakanova,** Y.A Savchenko, A.V. Ryzhkova, R.A. Titov, V.G. Druzhinin, M.Yu. Sinitsky, M.A. Asanov // J Cancer Res Clin Oncol. - 2017. - V. 143(11). - P.2235-2243.

6. Minina, V.I., Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution / V.I. Minina, M.Yu. Sinitsky, V.G. Druzhinin, A. Fucic, **M.L. Bakanova,** A.V. Ryzhkova, Y.A. Savchenko, A.A. Timofeeva, R.A. Titov, E.N. Voronina, V.P. Volobaev, V.A. Titov // Eur. J. Cancer Prevention. - 2018. – V.27(1). P.6-12.

7. **Баканова, М.Л.** Цитогенетические нарушения у больных раком легкого: феномен rogue cells в клетках крови / М.Л. Баканова, В.И. Минина, А.А. Тимофеева, Т.А. Головина, Я.А. Савченко, А.В. Рыжкова, Р.А. Титов, М.А. Асанов, В.А. Титов, И.А. Вафин // Медицинская Генетика. - 2018. - Т. 17. - № 2 (188). - С. 18–23.

8. Minina, V.I. Polymorphisms in DNA repair genes in lung cancer patients living in a coal-mining region / V.I. Minina, **M.L. Bakanova**, O.A. Soboleva, A.V. Ryzhkova, R.A. Titov, Y.A. Savchenko, M.Y. Sinitsky, E.N. Voronina, V.A. Titov, A.N. Glushkov // Eur J Cancer Prev. -2019. – V. 28(6). – P. 522-528.