

ASSOCIATION OF THE POLYMORPHISM OF DNA REPAIR GENES WITH CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN LUNG CANCER PATIENTS

M. L. Bakanova, V. I. Minina, Y. A. Savchenko, A. A. Timofeeva, O. A. Dudkina, V. A. Titov, and N. E. Verbitskaya

¹Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russia; ²Kemerovo Regional Clinical Oncological Dispensary, Kemerovo, Russia; ³Kemerovo Regional Patho-anatomical Bureau, Kemerovo, Russia; ⁴Kemerovo State University, Kemerovo, Russia

The results of the examination of association of polymorphisms of DNA repair genes and chromosomal aberrations in lung

cancer patients are discussed. A significant positive association between the *hOGG1* G/G genotypes, *XPB* G/G genotype and lung cancer was found. The *hOGG1* C/C genotypes were significantly negatively associated with lung cancer. The patient chromosomal aberration frequencies were significantly higher than in control. Carriers of all APE1 and *XPB* genotypes, *XRCC1* G/G genotype, *ADPRT* T/T genotype, *hOGG1* C/C and Ser/Cys genotypes had statistically significant differences in the level of the chromosomal aberrations between patient and control groups. Statistically significant differences in the level of chromosomal aberrations between *XPB* T/T and G/G genotype of lung cancer patients were observed.

Key words: lung cancer, DNA repair genes, chromosomal aberrations

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 618.11-006.04-085.277.3].015.4:577.21.08

Д.В. Хохрин¹, А.В. Хрунин¹, Ф.Г. Иванова², А.А. Мусеев³, В.А. Горбунова⁴, С.А. Лимборская¹

ФАРМАКОГЕНОМИКА ХИМИОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЦИСПЛАТИНА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ ЖЕНЩИН ИЗ ЯКУТИИ

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, 123182, Москва estecan@mail.ru; ²Государственное бюджетное учреждение Республики Саха (Якутия) Якутский республиканский онкологический диспансер, 677005, Якутск; ³Медицинский центр Банка России, 117593, Москва; ⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение Российской онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, 115478, Москва

Полиморфизм ДНК является одним из важнейших факторов, определяющих индивидуальные различия в реакциях пациентов на одни и те же лекарственные препараты. В настоящей работе проведена оценка взаимосвязи между полиморфизмом 106 генов, охватывающих ключевые системы жизнедеятельности клетки (метаболизм ксенобиотиков, репарация ДНК, регуляция клеточного цикла и апоптоза), и результатами химиотерапии на основе цисплатина у больных раком яичников женщин из Якутии. Выявлена ассоциация между полиморфизмом гена *CDKN1B* (rs34330) и частотой полных ремиссий. Показана значимость аллельного статуса данного локуса и для выживаемости без прогрессирования. Аллельный статус локусов гена *EPXN1* (rs2234922 и rs2260863) был ассоциирован с ухудшением слуха у больных, а полиморфизм гена *NBN* (rs1063045) коррелировал с развитием тяжелой рвоты.

Ключевые слова: цисплатин, фармакогенетика, химиотерапия, рак яичников, якуты

Введение

Цисплатин и его производные (карбоплатин, оксалиплатин) являются одними из наиболее активных цитостатиков и входят в схемы химиотерапии многих злокачественных новообразований [1—3]. Однако наряду с высокой активностью эти препараты характеризуются значительной токсичностью, вызывая тошноту, рвоту, миело-, нейро- и нефротоксическое действие [4]. При этом также имеют место и значительные индивидуальные вариации в чувствительности больных к самой химиотерапии. Будучи трудно прогнозируемыми, и те, и другие осложняют эффективность клинического использования соединений платины, что предполагает необходимость поиска маркеров, которые могли бы быть использованы для скрининга пациентов до начала лечения.

Среди прочих, на роль таких маркеров выдвигаются индивидуальные различия в последовательностях молекул ДНК (однонуклеотидные замены, повторяющиеся последовательности, инсерции,

делеции) [5]. Их анализ уже дал практические результаты, относящиеся к таким препаратам, как, например, меркаптопурин и иринотекан [6]. В то же время данные, касающиеся фармакогенетики препаратов платины, менее определены и, несмотря на многочисленные исследования, сколько-нибудь целостной ее картины пока не сформировано. Последнее, очевидно, связано с многогранностью метаболизма и механизмов токсического действия цисплатина и его аналогов [7], которые трудно оценить с применением анализа ограниченного числа полиморфных локусов в нескольких генах (главным образом, *GSTP1*, *ERCC1* и *ERCC2*), что имеется в большинстве проведенных на сегодняшний день исследований [8]. Для решения этой задачи требуется одновременное исследование полиморфизма многих генов.

В настоящей работе представлены результаты систематического анализа взаимосвязей между полиморфизмом 228 локусов из 106 генов, вовлеченных в ключевые для реализации токсических эффектов различных лекарственных средств внутриклеточные пути, и результатами химиотерапии на основе цисплатина у больных раком яичников женщин якутской этнической группы. Выбор данной группы больных был обусловлен большей, в сравнении с русскими больными, чувствительностью якутов к токсическому действию препаратов платины [9].

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований служила геномная ДНК, полученная из лейкоцитов периферической крови больных раком яичников женщин, получавших цисплатин-содержащую химиотерапию (цисплатин 100 мг/м² + циклофосфамид 600 мг/м² внутривенно каждые 3 нед) на базе Якутского республиканского онкологического диспансера (г. Якутск). Этническую принадлежность определяли путем анкетирования: в исследование включали лишь женщин-якуток, в роду которых до

Таблица 1

Побочные действия химиотерапии, зафиксированные у больных раком яичников женщин из Якутии

Побочный эффект	Степень токсичности				
	0	I	II	III	IV
	число больных				
Нейтропения	2	11	32	34	8
Анемия	7	34	40	4	2
Тромбоцитопения	65	21	0	0	1
Нефротоксичность	42	37	8	0	0
Ототоксичность	49	25	5	5	0
Нейропатия	26	41	18	2	0
Рвота	0	10	44	26	7

второго поколения включительно отсутствовали межэтнические браки, и предки которых проживали на территории Якутии.

Всем больным планировалось проведение 6 циклов химиотерапии; лечение прекращалось раньше в случае прогрессирования или тяжелых побочных действий (таким больным назначалась химиотерапия 2-й линии вне рамок исследования). Во время каждого курса оценивались побочные действия химиотерапии по стандартным критериям Национального Института Рака (National Cancer Institute—Common Toxicity Criteria version 2.0). Регистрации подлежали все побочные действия, однако особо выделялись нефротоксичность, ототоксичность, нейротоксичность, нейтропения, тромбоцитопения, анемия и рвота. После каждых 2 курсов больным назначали обследование для оценки эффекта.

Выделение и очистку образцов ДНК осуществляли стандартным методом, основанным на использовании протеиназы К с последующей фенол-хлороформной экстракцией [10]. Генотипирование полиморфных локусов проводили с использованием микрочипов "DNA repair single nucleotide polymorphisms detection test" в соответствии с протоколом компании-производителя ("AsperBiotech", Эстония). Суммарно каждый образец ДНК был протестирован по 228 полиморфным локусам из 106 генов, среди которых гены: 1) репарации ДНК (*OGG1, PCNA, ERCC1, ERCC5, MGMT, XRCC1, XRCC2, XRCC3, FANCG, APEX1, POLB, ERCC4, BARD1, BRCA1, BRCA2, FANCD2, LIG1, LIG4, MLH1, PARP1, PARP4, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NBN, PMS2, RAD9A, RAD23B, RAD51, RAD54, RAD54B, XPA, XPC, XRCC4, XRCC5, ERCC2, LIG3, RFC1*); 2) регуляции клеточного цикла и апоптоза (*TP53, ATM, CASP3, CASP9, CASP10, CCND1, CCNH, CDK7, CHEK2, GADD45A, NOD2, RB1, RESQL, TERT, TP53BP1, TP53BP2, CDKN1A, CDKN2A, MDM2, ATR*); 3) метаболизма ксенобиотиков (*CYP2E1, SULT1A1, SOD2, COMT, NAT1, NAT2, ADH1C, GSTP1, GSTA2, GSTM1, NQO1, GSTA4, CYP2A6, CYP2C19, CYP2D6(8), CYP2C9, CYP1A1, CYP1A2, ALDH, CYP3A4, CYP1B1, TPMT, SULT1A2, ALDH1B, EPHX1, GSTM3, GSTT1, CYP2C18*); 4) транспорта (*ABCB1, ABCG2, SLC6A3, TCN2*); 5) с иной функцией (*CDA, MTHFR, MTHFD1, MTR, MTRR, NT5E, CBS, AHRH, FSHR, DRD2, GRPR, AHR, DDX25*).

Статистическую обработку результатов генотипирования проводили с использованием программ STATISTICA 6 (анализ кривых выживаемости (StatSoft, Tulsa, OK, USA), PowerMarker 3.25 (сравнение распределений генотипов в группах больных [11]) и GraphPad InStat 3.00 (расчет величин отношения шансов (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Итоговая анализируемая группа больных составила 87 человек. У большинства больных (53 человека) была диагностирована III стадия рака яичников; I, II и IV стадии заболевания имели соответственно 1, 8 и 25 больных. Медиана жизни без прогрессирования составила 8 мес, медиана общей выживаемости — 29 мес.

Так как из 87 пациентов 11 получали лечение в адъювантном режиме, оценка непосредственной эффективности химиотерапии была возможна лишь у 76 больных. Полные ремиссии были зарегистрированы у 13 человек. У 31 больной были диагностированы частичные ремиссии. В 13 случаях наблюдалась стабилизация и в 19 — прогрессирование. Для дальнейшего анализа больные были разделены на 2 группы: с полной ремиссией и без таковой (медиана жизни без прогрессирования у больных с полными ремиссиями составила 23 мес, тогда как в остальных группах она не превышала 8 мес). Статистически значимые различия в распределении генотипов между пациентами с полными ремиссиями и без таковых были отмечены для полиморфного локуса гена *CDKN1B* (C/T, rs34330; $p = 0,0014$). Генотипы CC и CT встречались среди пациентов обеих групп, тогда как генотип TT обнаруживался лишь у тех, у кого полной ремиссии достичь не удалось (у 28 из 63 больных).

Аллельный статус локуса rs34330 коррелировал и

с временем жизни без прогрессирования ($\chi^2 = 10,555, p = 0,0051$). Медиана времени до прогрессирования в группе больных с генотипом TT составила 6 мес, тогда как в группах CT и CC этот показатель был равен 10 и 9 мес соответственно. Однако при исключении из анализа больных с адъювантным режимом лечения найденная ассоциация становилась менее выраженной ($\chi^2 = 6,773, p = 0,034$).

Общая выживаемость была ассоциирована с полиморфизмом генов *CYP1A1* (T/C, rs4646903, $\chi^2 = 9,917, p = 0,0070$) и *CYP1A2* (C/T, rs2470890, $\chi^2 = 9,868, p = 0,0072$). Выявленные ассоциации оставались значимыми и после исключения из анализа группы больных, для которых химиотерапия проводилась в адъювантном режиме ($\chi^2 = 11,441, p = 0,0034$ и $\chi^2 = 10,690, p = 0,0048$, соответственно).

Побочные действия химиотерапии оценивались у всех 87 больных. Количественные оценки выбранных параметров токсичности в группе больных из Якутии приведены в табл. 1. Для исследования взаимосвязи между тем или иным генотипом и побочными эффектами химиотерапии пациенты, в зависимости от клинической значимости регистрируемой выраженности токсичности, были объединены в группы, условно соответствующие хорошей и плохой переносимости. С этих позиций нейтропения 3—4-й степени, анемия 2—4-й степени, нейропатия 2—3-й степени, рвота 3—4-й степени, а также любая степень тромбоцитопении, ототоксичности и нефротоксичности рассматривались как клинически значимые и составляли группы плохой переносимости лечения. Сравнение распределений генотипов в группах выявили статистически значимые ассоциации с полиморфизмом генов *EPXHI* (A/G, rs2234922, $p = 0,0015$; C/G, rs2260863, $p = 0,0015$) и *NBN* (G/A, rs1063045, $p = 0,0071$). При этом аллельный статус локусов *EPXHI* был ассоциирован с ухудшением слуха у больных, полиморфизм же *NBS1* коррелировал с развитием тяжелой рвоты. Применительно к отдельным генотипам было найдено, что фактором риска развития тяжелой рвоты у больного является гетерозиготный статус локуса rs1063045. В случае же ототоксичности шансы появления проблем со слухом были выше у обладателей наиболее часто встречающихся генотипов по локусам rs2234922 и rs2260863 (табл. 2).

Сравнение полученных результатов с данными литературы позволяет предположить, что по-

Отношение шансов, рассчитанных для генотипов локусов, ассоциированных с токсичностью химиотерапии у якутских больных*

Токсичность	Полиморфизм	Генотип	Число больных		OR**	95% CI***	p
			хорошая переносимость лечения	плохая переносимость лечения			
Ототоксичность	<i>EPXH1</i> rs2234922	AA	36	35	26,260	1,502—458,98	0,0005
		AG	10	0	0,053	0,003—0,938	0,0043
		GG	3	0	0,187	0,009—3,743	0,2620
Рвота	<i>NBN</i> rs1063045	GG	15	4	0,359	0,108—1,195	0,1116
		AG	22	25	4,545	1,734—11,917	0,0019
		AA	17	4	0,300	0,091—0,990	0,0689

*Ввиду того, что локусы rs2234922 и rs2260863 оказались сцепленными, рассчитанные величины OR приведены лишь для генотипов по первому из них.

**OR (odds ratios) — отношение шансов,

***95% CI (confidence interval) — 95% доверительный интервал.

лиморфизм генов *CDKN1B*, *EPXH1* и *NBN* может иметь значение для эффективности химиотерапии цисплатином. Наиболее очевидным в этом отношении является полиморфизм локуса rs34330 в гене *CDKN1B*. Белковый продукт, кодируемый данным геном, участвует в регуляции клеточного цикла, где он, благодаря связыванию с комплексами циклинов E-CDK2 и D-CDK4, блокирует переход клетки в S-фазу. Рассматриваемая однонуклеотидная замена в локусе rs34330 (C > T) приводит к снижению уровня как мРНК, так и белка *CDKN1B* [12]. Результаты же недавно опубликованного мета-анализа указывают на взаимосвязь между прогнозом у больных немелкоклеточным раком легкого, основу химиотерапии которого составляют препараты платины, и уровнем экспрессии гена *CDKN1B* [3, 13]. Больные с высоким уровнем экспрессии *CDKN1B* имели более благоприятный прогноз [13]. Кодируемый геном *NBN* белок — важный компонент системы репарации двухцепочечных разрывов в молекулах ДНК. Такие разрывы могут возникать в том числе и при репарации межцепочечных сшивков, формируемых препаратами платины. Имеющиеся данные указывают на возможную связь отдельных полиморфных вариантов гена *NBN* с результатами химиотерапии на основе цисплатина, в частности, с выживаемостью без прогрессирования [14]. Сведения о роли эпоксидгидролаз в реализации цитотоксических эффектов цисплатина касаются в основном их участия в потенцировании индуцируемого цисплатином поражения почек [15]. Обнаруженная нами ассоциация полиморфизма *EPXH1* с ототоксичностью цисплатина может быть следствием предполагаемого сходства механизмов, лежащих в основе развивающихся на фоне использования цисплатина потери слуха и угнетения почечной функции [16].

Что же касается ассоциаций с полиморфизмом генов *CYP1A1* и *CYP1A2*, нехарактерных не только для метаболических путей цисплатина, но и циклофосамида, то они могут быть следствием включения в схемы лечения во второй и последующих линиях более широкого спектра

химиопрепаратов (таксанов, антрациклинов).

В целом же представленная работа является первым мультилокусным исследованием фармакогеномики цисплатина у больных из Якутии. Полученные данные могут быть использованы при разработке тест-систем, нацеленных на оценку эффективности (переносимости) назначения цисплатина конкретным пациентам еще на этапе выбора схемы лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 8805), программ "Молекулярная и клеточная биология" и "Фундаментальные науки — медицине" Российской академии наук, программы поддержки ведущих научных школ Президента Российской Федерации (грант № 4294.2012.4) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00913).

Сведения об авторах

Хохрин Денис Владимирович — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики человека, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, e-mail: ectecon@mail.ru

Хрунин Андрей Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной генетики человека, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, e-mail: khrunin@img.ras.ru, khrunin@rambler.ru

Иванова Феодосия Гаврильевна — канд. мед. наук, зав. отделением химиотерапии, Государственное бюджетное учреждение Республики Саха (Якутия) Якутский республиканский онкологический диспансер, e-mail: feodossiaiv@inbox.ru

Моисеев Алексей Андреевич — канд. мед. наук, зав. отделением общей онкологии, Медицинский центр Банка России, e-mail: moisseevalexey@hotmail.com

Горбунова Вера Андреевна — д-р мед. наук, проф., зав. отделением химиотерапии, Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский онкологический

научный центр имени Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, e-mail: veragorbounova@mail.ru

Лимборская Светлана Андреевна – д-р биол. наук, проф., зав. отделом молекулярных основ генетики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, человека, e-mail: limbor@img.ras.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2007; 7 (8): 573–84.
2. Muggia F. Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2009; 112 (1): 275–81.
3. Практические рекомендации по лечению злокачественных опухолей Общества онкологов-химиотерапевтов. RUSSCO, 2012 Available at: <http://www.rosoncweb.ru/standarts/RUSSCO/>.
4. Rabik C.A., Dolan M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer. Treat. Rev.* 2007; 33 (1): 9–23.
5. Monzó M., Navarro A., Ferrer G., Artells R. Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clin. Transl. Oncol.* 2008; 10 (10): 628–37.
6. O'Donnell P.H., Ratain M.J. Germline pharmacogenomics in oncology: decoding the patient for targeting therapy. *Mol. Oncol.* 2012; 6 (2):251–9.
7. Jung Y., Lippard S.J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem. Rev.* 2007; 107 (5): 1387–407.
8. HuGE Navigator: An integrated, searchable knowledge base of genetic associations and human genome epidemiology Available at: <http://hugenavigator.net/HuGENavigator/home.do> (accessed 27 February 2013).
9. Khrunin A., Ivanova F., Moisseev A., Khokhrin D., Sleptsova Y., Gorbunova V. et al. Pharmacogenomics of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients of different ethnic origins. *Pharmacogenomics*. 2012; 13 (2): 171–178.
10. Milligan B.G. Total DNA isolation. In: Hoelzel A.R., ed. *Molecular genetic analysis of populations*. London: Oxford University Press; 1998: 29–60.
11. Liu K., Muse S.V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 2005; 21 (9): 2128–9.
12. Landa I., Montero-Conde C., Malanga D., De Gisi S., Pita G., Leandro-García L.J. et al. Allelic variant at -79 (C>T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels. *Endocr. Relat. Cancer*. 2010; 17 (2): 317–28.
13. Zhuang Y., Yin H.T., Yin X.L., Wang J., Zhang D.P. High p27 expression is associated with a better prognosis in East Asian non-small cell lung cancer patients. *Clin. Chim. Acta*. 2011; 412 (23-24): 2228–31.
14. Xu J.L., Hu L.M., Huang M.D., Zhao W., Yin Y.M., Hu Z.B. et al. Genetic variants of NBS1 predict clinical outcome of platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer in Chinese. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 2012; 13 (3): 851–6.
15. Liu Y., Webb H.K., Fukushima H., Micheli J., Markova S., Olson J.L. et al. Attenuation of cisplatin-induced renal injury by inhibition of soluble epoxide hydrolase involves nuclear factor κB signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012; 341 (3): 725–34.
16. Deavall D.G., Martin E.A., Horner J.M., Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J. Toxicol.* 2012; 2012: 645–460.

Поступила 15.07.13

PHARMACOGENOMICS OF CISPLATIN-BASED CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER PATIENTS FROM YAKUTIA

D. V. Khokhrin¹, A. V. Khrunin¹, F. G. Ivanova², A. A. Moisseev³, V. A. Gorbunova⁴, and S. A. Limborska¹

¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ²Yakutsk Republic Cancer Clinic, Yakutsk, Russia; ³Medical Center, Bank of Russia, Moscow, Russia; ⁴Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

DNA polymorphism is an important component of the inter-individual variation in reactions of patients to the same drugs. In this work, evaluation of the association between polymorphisms in 106 genes involved in key processes of cellular activity (xenobiotic metabolism, DNA repair, the cell cycle, and apoptosis), and outcomes in a cohort of Yakut ovarian cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy was carried out. The polymorphism in the *CDKN1B* gene (rs34330) was found to be associated with complete tumor response and progression-free survival. SNPs in *EPXH1* gene (rs2234922 and rs2260863) were correlated with hearing impairment. A SNP in *NBN* gene (rs1063045) was associated with severe emesis. **Key words:** cisplatin, pharmacogenomics, chemotherapy, ovarian cancer, Yakuts