

На правах рукописи



Белопольская Олеся Борисовна

**Генетические ассоциативные исследования предрасположенности
к злокачественным новообразованиям мозга у детей**

03.02.07 - генетика

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель: **Рубанович Александр Владимирович**
Доктор биологических наук Зав. лаб. экологической генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук, профессор **Пелевина Ирина Ивановна**
Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Кандидат биологических наук **Боринская Светлана Александровна**
Ведущий научный сотрудник лаборатории анализа генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

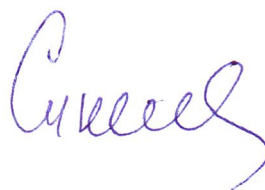
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Российской академии медицинских наук, г. Москва

Защита диссертации состоится 23 мая 2013 года в 15:00 на заседании диссертационного совета Д.002.214.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д.3. Тел.(499)135-62-13, факс: (499)132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru, адрес в Интернете: www.vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Автореферат диссертации разослан _____ апреля 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Т.А. Синельщикова

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. За последнее время заболеваемость злокачественными новообразованиями (ЗНО) мозга выросла в большинстве развитых стран, особенно среди детей дошкольного возраста. При этом пик заболеваемости приходится на возраст от 2 до 7 лет. В настоящее время уровень заболеваемости онкологическими заболеваниями составляет 15–16 человек на 100 000 детского населения в год. Ежегодно в России диагноз рак ставится 5000 детей. Из них 1000 детей заболевает злокачественными опухолями мозга.

В 80% случаев диагноз детям удается поставить лишь на 3-4 стадии развития опухоли. По данным Всемирной организации здравоохранения, на 100 умерших в возрасте 1-4 лет - 9,8% и 5-14 лет - 14,3% приходится на злокачественные опухоли.

Опухоли головного мозга у детей встречаются в 5—8 раз реже, чем у взрослых, и составляют 16—20% от всех новообразований в детском возрасте. Около 25% опухолей нервной системы, наблюдающихся у детей, приходится на первые 3 года жизни. Мальчики болеют несколько чаще (58%), чем девочки (42%).

Более 70% всех опухолей головного мозга у детей раннего возраста составляют нейроэктодермальные внутримозговые опухоли-глиомы или глиальные опухоли (астроцитомы, эпендимомы, глиобластомы); данная цифра превышает заболеваемость этим типом опухоли у взрослых в 2 раза. Значительно реже обнаруживаются опухоли мезодермального происхождения (13%). Врожденные и эмбриональные опухоли (тератомы, холестеатомы) составляют 0,8—2% от всех опухолей нервной системы.

Среди опухолей нейроэктодермального происхождения основную массу составляют астроцитомы (28—50%). По данным Института нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко АМН СССР, астроцитомы составляют 33% среди опухолей нервной системы у детей первых трех лет жизни, а медуллобластомы — 14%, что в 4—6 раз превышает аналогичные показатели у взрослых. Нередкими опухолями у детей являются краниофарингиомы, эпендимомы.

При этом прогнозируется дальнейший рост количества опухолевых заболеваний в развитых странах.

Несмотря на это, показатели смертности в большинстве видов детских онкологических заболеваний резко сократились. Процент выживаемости при лечении онкологических заболеваний у детей увеличился. Ныне пять из шести заболевших детей, около 84%, остаются в живых более пяти лет с момента постановки диагноза, что в медицине приравнивается к полному выздоровлению.

Развитие осложнений при проведении химио- и лучевой терапии у детей практически неизбежно. У взрослых пациентов при проведении лучевой терапии риск ближайших и отдаленных осложнений минимален. У детей этот риск в несколько раз выше, а потому применение таких типов терапии имеет множество ограничений. Однако восстановительные способности некоторых органов и систем у детей выше, чем у взрослых.

На сегодняшний день при лечении онкологических заболеваний применяются методы персонализированной медицины. Суть этого метода состоит в том, что при подборе препаратов для лечения опухоли учитываются индивидуальные особенности организма, которые могут влиять на эффективность применяемой терапии. Данный метод применяется для достижения лучших результатов в процессе лечения и для снижения негативных последствий связанных лечением. Индивидуальные генетические особенности могут влиять как на риск развития онкологического заболевания, так и на риск развития осложнений при применении химио- и радиотерапии.

Степень научной разработанности проблемы. По частоте возникновения у детей опухоли мозга стоят на втором месте после рака крови. Несмотря на высокую частоту встречаемости опухолей мозга у детей среди всех солидных опухолей (составляет 20% всей онкологической заболеваемости в детском возрасте) по педиатрическим опухолям мозга есть всего несколько ассоциативных исследований в разных этнических группах (Idowu, Idowu, 2008; Сальникова и др., 2010; Ezer et al., 2002). В нескольких работах изучалось взаимодействие среды и генотипа в связи с заболеваемостью злокачественными новообразованиями мозга в детском возрасте (Nielsen et al., 2005; Nielsen et al., 2010). Ассоциации ряда аллелей полиморфных генов с развитием опухолей мозга у взрослых рассматривается в литературе

несколько чаще (Song et al., 2012; Cengiz et al., 2008; Coutinho et al., 2010; Schwartzbaum et al., 2007). Однако и в этих статьях круг рассматриваемых полиморфных сайтов достаточно невелик. Ассоциация полиморфных аллелей определенных сайтов с развитием осложнений лучевой терапии у детей с опухолями мозга ранее не изучалось.

Цель и задачи исследования. Целями исследования являлось:

- Исследовать роль полиморфизма генов 1 и 2 стадий детоксикации ксенобиотиков, репарации и ряда других генов у детей со злокачественными новообразованиями мозга.
- Исследовать ассоциацию аллелей и генотипов генов 1 и 2 стадий детоксикации ксенобиотиков, репарации и ряда других генов с эффектами облучения *in vivo* и *in vitro*.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. Изучить ассоциации аллелей и генотипов генов *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *AHR*, *XPB*, *XRCC1*, *RAD 51*, *ACE*, *CCR5*, *nNOS* с развитием опухолей мозга у детей.
2. Изучить мультилокусные эффекты аллелей и генотипов по исследуемым локусам с развитием опухолей мозга у детей.
3. Исследовать гендерные различия ассоциаций аллелей и генотипов генов *CYP1A1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *AHR*, *XPB*, *XRCC1*, *RAD 51*, *ACE*, *CCR5*, *nNOS* с развитием опухолей мозга у детей
4. Изучить ассоциации аллелей и генотипов по исследуемым локусам с развитием осложнений после проведения лучевой терапии у детей с опухолями мозга и с частотами γ -индуцированных *in vitro* нестабильных хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови добровольцев.

Научная новизна.

- Впервые выявлена ассоциация увеличения риска развития опухолей мозга с полиморфизмом гена *CYP1A1* у детей.
- Впервые выявлена ассоциация увеличения риска развития опухолей мозга с полиморфизмом гена *GSTM1* у российских детей.

- Впервые выявлена ассоциация γ -индуцированных *in vitro* хромосомных aberrаций с полиморфизмом гена *RAD 51*.
- Впервые выявлены гендерные различия в ассоциации генетических маркеров с опухолями мозга у детей.

Положения выносимые на защиту.

1. Наличие минорных аллелей по 2-м локусам гена *CYP1A1* сопряжено с увеличением риска развития опухолей мозга у детей.
2. Наличие двойной делеции в генах *GSTM1* и *GSTT1* сопряжено с увеличением риска развития опухолей мозга у детей.
3. Существуют гендерные различия в ассоциации полиморфизма по локусам гена *CYP1A1* с риска развития опухолей мозга у детей.

Степень обоснованности научных результатов.

- результаты экспериментальной части работы, включающие выделение ДНК, аллель специфическую ПЦР реакцию, гельэлектрофорез и цитогенетический анализ материала, получены на сертифицированном оборудовании.
- выбор исследуемых генов основан на анализе функций этих генов и степени разработанности данной темы в публикациях;
- частоты аллелей по исследуемым генам, полученные в данной работе при рассмотрении выборки здорового контроля, соответствуют частотам аллелей европейцев, представленными в базе НарМар. Данный факт свидетельствует о корректности установленных частот.

Теоретическая и практическая значимость работы. Данная работа дополняет имеющиеся представления о причинах возникновения злокачественных новообразований мозга у детей, что в дальнейшем позволит разрабатывать пути лечения опухолей мозга, основываясь на особенностях развития данного заболевания у конкретного человека.

Апробация диссертации и публикации.

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, 3 – в тезисах научных конференций:

Основные результаты доложены на конференциях: VI Съезд Российского общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону. 14-18 мая 2010 г.; Конференция «Генофонды и генетическое разнообразие» Москва. 2010 г.; V Всероссийский с международным участием медико-биологический конгресс молодых ученых. Тверь. 3-8 декабря 2012 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть (методы исследований, результаты и обсуждение), заключение, выводы, список сокращений, список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 139 страницах, содержит 23 таблицы, и 26 рисунков. Список литературы включает 125 ссылок, из них 114 на английском языке.

Материалы и методы

Изученные выборки. Для изучения ассоциации заболевания опухолями мозга с генетическим полиморфизмом ДНК были взяты образцы периферической крови у 303 детей со злокачественными опухолями ЦНС (168 мальчика и 135 девочек), находившихся на лечении в лаборатории детской рентгенорадиологии ФГУ РНЦРР Росмедтехнологий в 2007-2012 годах. Все исследуемые нами опухоли мозга являлись злокачественными. Исследование было одобрено Этической комиссией ФГУ РНЦРР Росмедтехнологии. Включение детей в исследование во всех случаях производился после подписания родителями больных детей формы информированного согласия.

Средний возраст больных детей $8,66 \pm 0,24$ лет. Наиболее распространенные опухоли в изученной когорте – это эмбриональные опухоли мозга (N=123) (в т.ч. медуллобластома (N=105), примитивные нейроэктодермальные опухоли (N=12), другие эмбриональные опухоли (N=6)) глиальные опухоли мозга (N=161) (в т.ч. опухоль ствола мозга (N=51), анапластическая эпендимома (N=45), глиобластома (N=32), астроцитомы (N=33)). Также в когорте представлены герминогенные опухоли (N=15), другие опухоли мозга (N=4). Контрольная группа состояла из 467 человек со средним возрастом $27,40 \pm 0,43$ лет.

Для изучения влияния аллелей исследуемых локусов на частоту индуцированных aberrаций хромосом были взяты образцы периферической крови у 115 молодых здоровых мужчин – курсантов Военно-технического университета (г. Балашиха). Исследования были одобрены Этическими комиссиями ИОГен РАН и Военно-технического университета. Забор крови во всех случаях производился после подписания формы информированного согласия. Цитогенетический анализ был проведен для 96 добровольцев при изучении частоты спонтанных aberrаций и для 99 человек по тесту индуцированных aberrаций.

Цитогенетический тест на соматическую мутабельность. В заранее приготовленные стерильные пробирки с гепарином (50-100 ед. гепарина лития в расчете на 1 мл крови) вносили 5-6 мл крови и закрывали стерильной пробкой. Каждая пробирка за 1 час до культивирования подвергалась γ -облучению в дозе 1 Гр (Соб60, мощность дозы 1,37 Гр/мин). Приготовление препаратов с метафазными клетками для учета aberrаций хромосом осуществляли по стандартной методике (Сальникова и др., 2008).

Генотипирование по генам кандидатам.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови, которую брали в вакутейнеры с K_2 ЭДТФ или K_3 ЭДТА и хранили при $t = -18$ °С. ДНК выделяли с помощью коммерческого набора DiatomTM DNA Prep 200 (фирма ИзоГен).

ПЦР – амплификация. Методической основой генотипирования явилась аллель-специфическая тетрапраймерная ПЦР. Подбор праймеров осуществлялся с использованием программы Primer3 v.4.0.0 (<http://primer3.wi.mit.edu/>). В дальнейшем производилась оптимизация условий ПЦР-амплификации (Календарь, Сиволап, 1995). Детекция результатов ПЦР осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Статистическая обработка полученных результатов. Для получения описательной статистики был использован пакет программ «WinSTAT 2003.1», интегрированный в Excel. Значимость межгрупповых различий частот оценивалась с помощью точного критерия Фишера (пакет программ WinPePi, адрес свободного доступа <http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>).

Оценки частот генотипов, генов и гаплотипов, а также их эффектов были получены с помощью on-line программы SNPStats. Программа позволяет строить регрессионные модели количественных и бинарных признаков для произвольных типов детерминации (доминантный, рецессивный, аддитивный), используя линейную и логистическую регрессию (Sole et. al., 2006). Адрес свободного доступа: <http://bioinfo.iconcologia.net/index.php?module=Snpstats>.

Результаты и обсуждение

Изучение роли полиморфизма генов в заболеваемости ЗНО мозга

Анализ ассоциаций заболеваемости с генотипами во всей выборке больных детей. Контрольная выборка и выборка детей с опухолями мозга были прогенотипированы по 15 локусам 11 генов. В когорте больных детей по типам опухолей были выделены две наиболее многочисленные группы: с глиальными и с эмбриональными опухолями мозга. Средний возраст больных детей составил $8,66 \pm 0,24$ лет, здорового контроля – $27,40 \pm 0,43$ лет. Частоты аллелей исследуемых локусов контрольной выборки совпадают с частотами данных аллелей у европейцев представленными в базе NCBI dbSNP и HarMap. В таблице 1 сопоставлены частоты встречаемости аллелей и генотипов исследуемых генов в контрольной выборке и среди европейцев. В таблице представлены частоты аллелей по локусам, показавшим значимые эффекты в отношении увеличения риска развития опухолей мозга у детей.

Повышенную предрасположенность к злокачественным новообразованиям мозга была обнаружена у носителей минорного аллеля -27+606G гена *CYP1A1* OR=1,67, $p=0,009$ (рецессивная модель). В частности была обнаружена предрасположенность к заболеванию глиальными опухолями мозга OR=1,54, $p=0,041$ (рецессивная модель). При рассмотрении лог-аддитивной модели значимость полученного результата была выше OR=1,41, $p=0,0077$. Второй сайт A1384G гена *CYP1A1* также показал свою роль в заболеваемости раком мозга, но уже по отношению к эмбриональным опухолям мозга OR=2,66, $p=0,0026$. Однако при

проведении проверки на множественность сравнений не потерял значимость лишь эффект сайта A1384G гена *CYP1A1* в отношении эмбриональных опухолей мозга.

Таблица 1. Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов в контрольной выборке и в базе NCBI dbSNP.

Локусы и аллели		Частоты аллелей (%)	
		Контрольная выборка	Европейцы по базе NCBI dbSNP
<i>CYP1A1</i> T-27+606G rs2606345	T	65,5	63,6
	G	34,5	36,4
<i>CYP1A1</i> A1384G rs1048943	A	96,8	96,9
	G	3,2	3,1
<i>CYP1A1</i> T947+242C rs4646903	T	90,6	90,0
	C	9,4	10,0
<i>GSTM1</i> Del(D/D)-Ins (I*)	D/D	43,8	50,0*
	I/*	56,2	50,0
<i>GSTT1</i> Del(D/D)-Ins (I*)	D/D	20,8	20,0
	I/*	79,2	80,0

По локусу *GSTM1* выявлено повышение риска развития опухолей мозга у гомозигот по делеции этого гена, в частности, повышение риска развития глиальных и к эмбриональных опухолей мозга (OR=1,88, p=0,00003; OR=2,05, p=0,0001; и OR=1,88, p=0,002 соответственно). Все результаты остаются значимыми при проверке на множественность сравнений.

Анализ гаплотипов. При анализе гаплотипов гена *CYP1A1* было обнаружено, что гаплотип -27+606G, 1384A, 947+242C сопряжен с увеличенным риском развития анапластической эпендимомы OR=2,76, p=0,0072.

Мультилокусный анализ. При анализе сочетанных вариантов минорных аллелей обнаружено, что у носителей 2 и более минорных аллелей по гену *CYP1A1* риск развития анапластической эпендимомы увеличивается OR=2,48, p=0,007, по сравнению с носителями одного и менее минорных аллелей (рис. 1).

* Серой заливкой отмечены локусы, в отношении которых в базе NCBI dbSNP отсутствуют данные по частотам генотипов. Данные взяты из статей приведенных на рисунках 16 и 17 диссертации.

При рассмотрении межлокусных взаимодействий обнаружено усиление эффекта у гомозигот по делеции в двух генах *GSTM1* и *GSTT1* в отношении эмбриональных опухолей мозга $OR=2,54$, $p=0,003$ (рис. 2). И в частности, увеличение риска развития медуллобластомой $OR=2,72$, $p=0,003$.

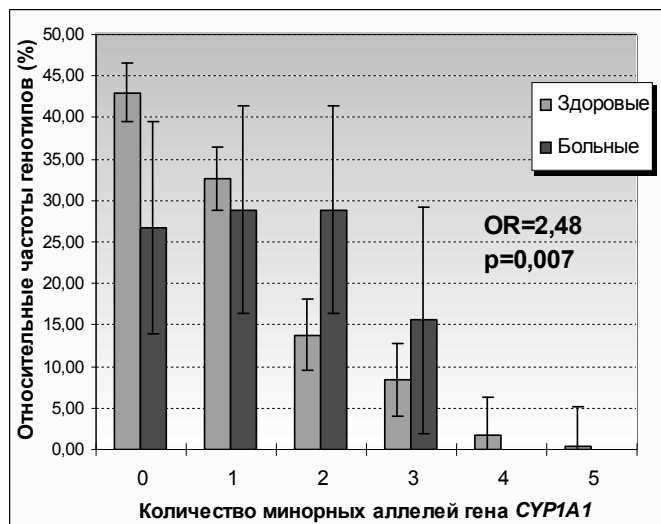


Рис. 1. Увеличение количества минорных аллелей по гену *CYP1A1* среди больных с анапластической эпендимомой и в контрольной выборке.

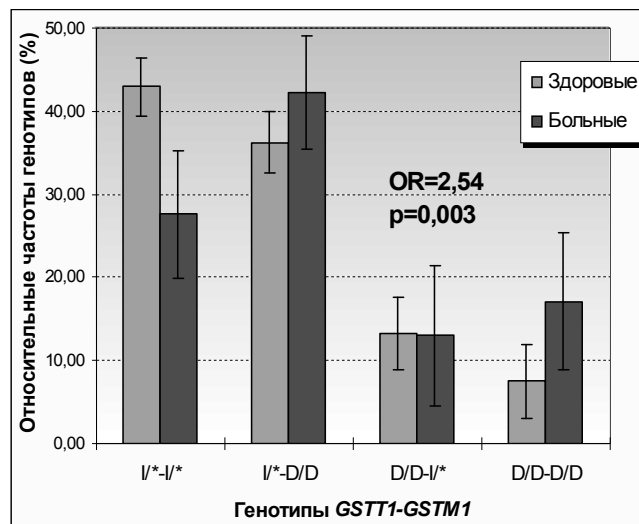


Рис. 2. Встречаемость сочетанных вариантов по локусам *GSTT1-GSTM1* среди больных эмбриональными опухолями мозга и в контрольной выборке.

Анализ различий ассоциаций генотип-болезнь у лиц разного пола. Была проведена стратификация выборок по полу и этнической принадлежности. В результате чего была выделена группа европейцев (представленная наибольшим количеством образцов), внутри которой были выделены группы мальчиков и девочек. Дальнейшее исследование проводилось внутри этих групп.

Среди мальчиков у гомозигот по делеции гена *GSTM1* обнаружена предрасположенность к заболеванию опухолями мозга в целом, и в частности к глиальным и к эмбриональным опухолям мозга ($OR=2,39$, $p=0,00002$; $OR=2,70$, $p=0,0002$ и $OR=2,08$, $p=0,011$ соответственно).

Среди девочек носители минорного аллеля -27+606G гена *CYP1A1* имеют склонность к заболеванию опухолями мозга в целом и глиальными опухолями мозга ($OR=1,93$, $p=0,0058$ и $OR=2,76$, $p=0,001$ соответственно) (доминантная модель). Однако при проверке на множественность сравнений статистически значимой

остается лишь ассоциация заболеваемости глиальными опухолями мозга с носительством минорного аллеля -27+606G гена *CYP1A1*.

При рассмотрении межлокусных взаимодействий среди мальчиков обнаружено усиление эффекта у гомозигот по делеции в двух генах *GSTM1* и *GSTT1* в отношении опухолей мозга в целом. Гомозиготы по делеции в этих двух генах имеют повышенный риск возникновения опухоли мозга $OR=3,20$, $p=0,0005$ (рис. 3). Так же усиление эффекта наблюдалось в отношении эмбриональных опухолей мозга. У гомозигот по делеции в двух генах *GSTM1* и *GSTT1* выше риск развития эмбриональных опухолей мозга $OR=3,67$, $p=0,003$ (рис. 4).

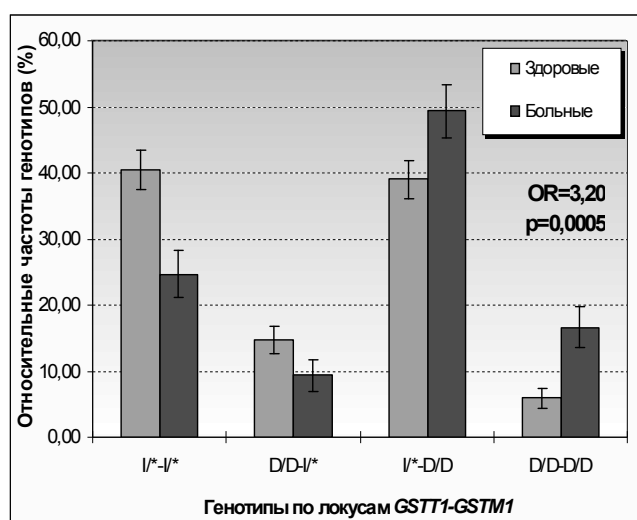


Рис. 3. Встречаемость сочетанных вариантов по локусам *GSTT1-GSTM1* среди мальчиков больных опухолями мозга и мальчиков контрольной выборки.

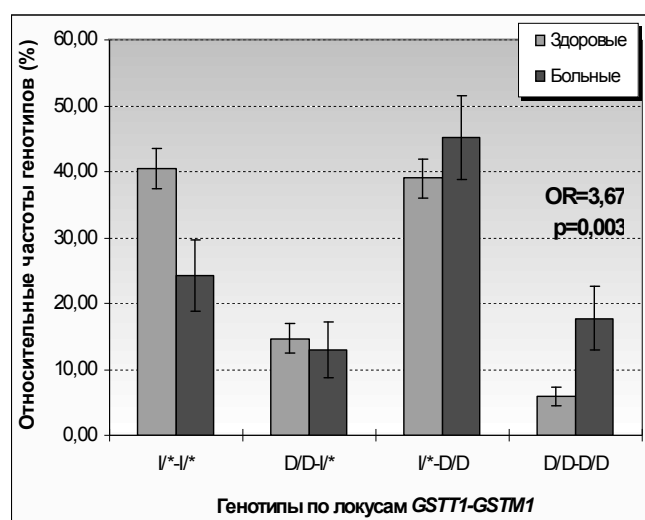


Рис. 4. Встречаемость сочетанных вариантов по локусам *GSTT1-GSTM1* среди мальчиков больных эмбриональными опухолями мозга и мальчиков контрольной выборки.

Анализ различий ассоциаций генотип-болезнь у лиц разного пола с учетом возраста вступления в период полового созревания

В период полового созревания организм человека претерпевает множество изменений, которые могут повлиять и на развитие опухолевых заболеваний. В тоже время известно, что пик заболеваемости опухолями мозга у детей приходится на возраст от 2 до 7 лет. Помимо этого у взрослых и детей структура нейроонкологической заболеваемости сильно отличается, как по типам возникающих опухолей, так и по характеру протекания заболевания (Merchant et al., 2010). Исходя из этого целесообразно разделить исследуемую выборку по возрасту

манифестации заболевания: на возраст до вступления в пубертатный период (детский возраст и препубертатный период) и пубертатный период.

Выборки мальчиков и девочек были стратифицированы по возрасту наступления полового созревания. Согласно данным литературы для девочек возраст полового созревания соответствует 10 годам, а для мальчиков 12 годам.

В группе мальчиков до 12 лет у гомозигот по делеций гена *GSTM1* обнаружена предрасположенность к заболеванию опухолями мозга в целом, и в частности к глиальным и к эмбриональным опухолям мозга ($p=0,0009$, $OR=2,09$; $p=0,003$, $OR=2,31$ и $p=0,036$, $OR=1,93$ соответственно). Однако при проведении проверки на множественность сравнений последний результат теряет значимость. В отношении эмбриональных опухолей мозга наблюдается усиление эффекта, однако значимость его становится ниже, что может быть связано с уменьшением объема выборки.

Среди девочек до 10 лет наблюдается усиление эффекта в отношении глиальных опухолей мозга. Носители минорного аллеля $-27+606G$ гена *CYP1A1* имеют склонность к заболеванию глиальными опухолями мозга $p=0,0008$, $OR=3,11$ (доминантная модель). При проведении проверки на множественность сравнений данный эффект остается значимым. В отношении опухолей мозга в целом и глиальных опухолей наблюдается усиление эффекта по сравнению с данными, полученными на группе девочек до стратификации.

Данные по роли аллельных вариантов гена *CYP1A1* в канцерогенезе противоречивы и, по-видимому, эта роль в значительной степени определяется взаимодействием «генотип-среда» (Androutsopoulos et al., 2009).

Ген *CYP1A1* располагается на участке 15q22-24, а при наследственной предрасположенности к глиоме выявлена сопряженность заболевания с маркерами участка 15q23-q26.3, перекрывающими указанный локус (Paunu et al., 2002). В ассоциативных исследованиях у взрослых не выяснена ассоциация полиморфизма *CYP1A1* A1384G (Ile462Val) с риском глиомы и некоторых других злокачественных новообразований мозга (Trizna et al., 1998, Schwartzbaum et al., 2007, De Roos et al., 2003). Однако роль полиморфизма гена *CYP1A1* в детской нейроонкологии не изучалась.

Сайт однонуклеотидной замены (SNP) T-27+606G находится в первом интроне локуса CYP1A1. Вариант -27+606G обладает большей индуцибельностью в присутствии специфических субстратов (полициклические ароматические углеводороды как экзогенного, например пищевые продукты, промышленные загрязнения, табачный дым, так и эндогенного происхождения, например эстрогены). В отсутствие специфических субстратов активнее экспрессируется аллельный вариант -27+606T. Разнонаправленность влияния аллельных вариантов -27+606G и -27+606T на регистрируемые эффекты показана в двух независимых исследованиях: в экологически неблагоприятных условиях (промышленное загрязнение воздуха, курение) и в их отсутствие (Wang et al., 2008; Lam et al., 2010). Для полиморфизма T-27+606G показаны ассоциации с развитием рака легких (Rotunno et al., 2009), гормонально-зависимых опухолей (Figueroa et al., 2008), с концентрацией метаболитов половых гормонов, служащих субстратами для CYP1A1 (Sowers et al., 2006).

Другой аллель этого же гена 1384G приводит к повышенной активности фермента (Kisselev et al., 2005). Три сайта в локусе *CYP1A1*, изученные в настоящей работе, тесно сцеплены. Установленные нами характеристики неравновесия по сцеплению $D' > 0,9$, $p = 0,000$ близки к характеристикам, полученным нами ранее на других выборках (Сальникова, Замулаева и др., 2010; Сальникова, Зелинская и др., 2010). Показатели неравновесия по сцеплению не отличаются в группе больных и в контроле. До недавнего времени в европейских популяциях изучали три основных полиморфных сайта гена CYP1A1: T947+242C, A1384G и C4887A (Georgiadis et al., 2005). Так как полиморфизмы T-27+606G и A1384G имеет функциональный характер и частота этих аллелей выше, чем встречаемость минорных вариантов других полиморфных сайтов, они представляются перспективными маркерами для ассоциативных исследований мультифакторных заболеваний (МФЗ).

Нами были обнаружены гендерные различия в ассоциативных связях «генотип-заболеваемость опухолями мозга». Многие авторы указывают на разницу в заболеваемости опухолями мозга между мужчинами и женщинами (Kushnir, Tzuk-Shina, 2011; Dobes et al., 2011). Некоторое время считалось, что это может быть

связано с различиями гормонального фона у женщин и мужчин. Однако было показано, что у детей данная тенденция сохраняется вне зависимости от возраста, национальности, типа опухоли и т.д. Более того, при заболевании опухолями мозга мальчики имеют более негативный прогноз, чем девочки (Korshunov et al., 2010; Merchant et al., 2010; Jones et al., 2011). Это указывает на существование гендерных различий, которые широко влияют на канцерогенез и рост опухоли. Одним из объяснений большей склонности лиц мужского пола к опухолям по сравнению с женщинами может быть то, что у мужчин активность метаболизма глюкозы примерно в 2 раза выше, чем у женщин. Эта разница проявляется уже в первые часы эмбрионального развития (Ray et al., 1995; Vermejo-Alvarez et al., 2011). Примечательно, что именно активный метаболизм глюкозы необходим опухоли для развития (Cairns et al., 2011).

Участие гена цитохрома в развитии опухолей у лиц женского пола может быть объяснено следующими фактами: увеличенная активация митоген-активированной протеин киназы (МАПК) является общим механизмом нарушения регуляции пролиферации и выживания в астроцитомах и других видах рака. Эстрогены обладают ингибирующим действием по отношению к МАПК. В свою очередь МАПК активирует Jun-киназы и p38 ведущие к цитокин- и стресс-активированному апоптозу (McIlwain et al., 2006). Таким образом, чем больше в клетке эстрогенов, тем сильнее ингибируется МАПК и ингибируются апоптотические и пролиферативные процессы в клетках. Из чего следует, что у клеток появляется возможность репарировать возникшие нарушения и вступить в пролиферацию позже, но с меньшим количеством повреждений. Базальный уровень активации МАПК у женщин в 1,5 раза выше, чем у мужчин. В тоже время, женские астроциты более чувствительны к ингибированию МАПК эстрадиолом. (Sun et al., 2012). Кроме того, при лечении эстрогенами увеличена частота апоптоза в женских клетках мозга в большей степени, чем в мужских клетках мозга (Zhang et al., 2002). То есть увеличение уровня эстрогенов благотворно влияет на клетки и позволяет им либо исправить возникшие при репликации ошибки или запустить механизм клеточной смерти и не дать опухоли развиваться. В мужских астроцитах уровень эстрадиола

ниже, следовательно, риск развития опухоли выше. В мозге, эстрадиол производится из тестостерона через действия ароматазы. В женских клетках ароматаза экспрессируется более интенсивно, чем в мужских (Liu et al., 2007). Таким образом, женские астроциты более чувствительны к действию тестостерона/эстрадиола, чем мужские.

В нашем исследовании также зарегистрированы ассоциации возникновения злокачественных новообразований мозга с носительством делеционных вариантов *GSTT1* и *GSTM1*. Ассоциация аллелей этих генов с развитием опухолей мозга у детей показана для американской популяции (Ezer et al., 2002). Ассоциативных исследований злокачественных новообразований мозга у взрослых в связи с полиморфизмом глутатион S-трансфераз значительно больше. Например, результаты таких работ, выполненных в европейских популяциях, описаны в 12 публикациях (Trizna et al., 1998; Schwartzbaum et al., 2007; De Roos et al., 2003; Pinarbasi et al., 2005; Wrensch et al., 2004; Butler et al., 2003; Kondrat'eva et al., 1999; Elexpuru-Camiruaga et al., 1995; Kelsey et al., 1997; Wiencke et al., 1997; Coutinho et al., 2010). Результаты 7-ми из них и вышеуказанного исследования проведенного на детской когорте больных (Ezer et al., 2002) объединены в мета-анализе (Lai et al., 2005), выполненном для двух наиболее частых нозологических форм: глиом и менингиом. Согласно результатам мета-анализа, у европейцев делеционный вариант *GSTT1* значимо чаще встречался у больных менингиомой (OR=1,95). Для генов *GSTM1*(Ins/Del) и *GSTP1* A313G (Ile105Val) и соседнего с ним C341T (Ala114Val) различия по частотам аллелей между больными и здоровыми не выявлены. Еще в одном масштабном исследовании получены данные об отсутствии сопряженности полиморфизма генов *GSTM1* (Ins/Del), *GSTM3* (A63C), *GSTT1* (Ins/Del) с развитием глиом, глиобластом и менингиом (Schwartzbaum et al., 2007). Однако мы можем сказать, что сниженная способность к детоксикации ксенобиотиков может привести к повреждению ДНК в клетках агрессивными инородными веществами.

Полученные нами результаты соответствуют результатам, полученным другими исследователями (Pinarbasi et al., 2005; Trizna et al., 1998), и вносят вклад в

выявление генетических факторов риска развития злокачественных новообразований мозга у детей.

Влияние облучения на организм человека в зависимости от генотипа по исследуемым локусам

Изменчивость частоты индуцированных хромосомных aberrаций в зависимости от генотипов по кандидатным локусам у молодых здоровых добровольцев. Для определения числа индуцированных хромосомных aberrаций полученную от добровольцев кровь облучали. Далее лимфоциты крови использовали для приготовления препаратов с метафазными клетками.

С увеличением числа минорных аллелей гена *CYP1A1* T-27+606G частота дицентриков в лимфоцитах периферической крови снижается ($p=0,023$ по анализу множественной регрессии). Аналогично частота aberrаций хромосомного типа у гомозигот G/G была понижена по сравнению с лицами, которые имеют аллель T: $0,094 \pm 0,006$ против $0,112 \pm 0,002$, $p=0,005$ по критерию Манна-Уитни. Общее число aberrаций у гомозигот G/G выше по сравнению с лицами, которые имеют аллель T: $0,104 \pm 0,008$ против $0,125 \pm 0,003$, $p=0,008$ по критерию Манна-Уитни. Таким образом, ген *CYP1A1* ассоциирован с риском развития опухолей мозга и с частотой индуцированных aberrаций. Однако эффект оказываемый исследуемыми минорными аллелями этого гена имеет разнонаправленный характер.

В тоже время было обнаружено, что у носителей минорного аллеля C гена *RAD 51* C-98G частота дицентриков выше, чем у гомозигот G/G: $0,068 \pm 0,004$ против $0,057 \pm 0,002$, $p=0,003$ по критерию Манна-Уитни.

Анализ ассоциаций постлучевых осложнений с исследуемыми генотипами. Выборка больных детей была проанализирована на предмет осложнений лучевой терапии в сопряженности с исследуемыми генотипами. Для этого в исследуемой выборке сравнивались частоты встречаемости генотипов у детей, имевших постлучевые осложнения, и у детей, не имевших таких осложнений. Рассматривались следующие типы осложнений: эпидермит, винкристиновая

полинейропатия, эзофагит, заболевания дыхательных путей, синдром Кушинга, миелодепрессия.

Ассоциация аллелей и генотипов исследуемых генов с развитием осложнений при проведении лучевой терапии у детей ранее не изучалась. Только 3 вида осложнений показали ассоциацию с исследуемыми генотипами: это винкрестиновая полинейропатия, заболевания дыхательных путей, синдром Кушинга. В таблице 2 приведены значимые ассоциации постлучевых осложнений с исследуемыми генотипами. В качестве контроля брались облученные дети из этой же выборки, не имевшие осложнений после облучения. Однако все приведенные результаты становятся не значимыми при проведении проверки на множественность сравнений. Данные результаты можно объяснить тем, что доступные для анализа выборки очень малы. При сохранении данного эффекта результаты были бы значимы при увеличении выборки в 2 раза больше

Таблица 2. Частоты генотипов в группе облученных детей с постлучевыми осложнениями и без осложнений, величина коррелятивной связи возникновения осложнений.

Лocusы и генотипы	Заболевания органов дыхательной системы		P-value ¹ OR 95% CI	Винкрестиновая полинейропатия		P-value OR 95% CI	Синдром Кушинга		P-value OR 95% CI	
	Контроль Число случаев (%)	Осложнение Число случаев (%)		Контроль Число случаев (%)	Осложнение Число случаев (%)		Контроль Число случаев (%)	Осложнение Число случаев (%)		
<i>MTHFR</i> C665T rs1801133		n=291	n=12							
	C/C	146 (50,17)	9 (75,00)	0,139 (dom)*	n=294	n=9	0,174 (dom)	n=274	n=29	0,019 (dom) 0,36 0,16-0,84
	C/T	122 (41,92)	2 (16,67)	0,34	148 (50,34)	7 (77,78)	0,29	134 (48,91)	21 (72,41)	
	T/T	23 (7,90)	1 (8,33)	0,09-1,20	122 (41,50)	2 (22,22)	0,06-1,30	116 (42,34)	8 (27,59)**	
				24 (8,16)	0 (0,00)		24 (8,76)	0 (0,00)		
<i>XPD</i> T2251G rs13181		n=291	n=12							
	T/T	97 (33,33)	8 (66,67)	0,027 (dom) 0,25 0,08-0,81	n=294	n=9	0,19 (dom)	n=274	n=29	0,11 (dom) 0,53 0,25-1,15
	T/G	144 (49,48)	3 (25,00)		100 (34,01)	5 (55,56)	0,41	91 (33,21)	14 (48,28)	
	G/G	50 (17,18)	1 (8,33)		145 (49,32)	2 (22,22)	0,11-1,57	137 (50,00)	10 (34,48)	
				49 (16,67)	2 (22,22)		46 (16,79)	5 (17,24)		
NOS1 C276T rs2682826		n=290	n=12							
	T/T	19 (6,55)	0 (0,00)	0,78 (dom) 1,18 0,37-3,75	n=294	n=9	0,042 (dom) 0,14 0,02-1,01	n=273	n=29	0,52 (dom) 1,29 0,60-2,77
	T/C	114 (39,31)	6 (50,00)		19 (6,48)	0 (0,00)		19 (6,96)	0 (0,00)	
	C/C	157 (54,14)	6 (50,00)		119 (40,61)	1 (11,11)		105 (38,46)	15 (51,72)	
				155 (52,90)	8 (88,89)		149 (54,58)	14 (48,28)		

¹ Значимость межгрупповых отличий по двустороннему точному критерию Фишера

* В скобках указана модель, согласно которой вычислялась величина OR

** Серой заливкой обозначены генотипы ассоциированные с заболеванием

В данной работе рассматривались абберации, возникающие в соматических клетках под действием ионизирующего излучения. Возникновение аббераций является цитогенетическим тестом для оценки воздействия излучения на клетки.

Осложнения, возникающие при проведении лучевой терапии, также связаны с воздействием излучения на клетки. Следовательно, в основе возникновения осложнений после лучевой терапии и изменения частот aberrаций при действии ионизирующего излучения могут лежать общие генетические механизмы.

Аллельные варианты генов первой стадии детоксикации ксенобиотиков, связанные с ростом активности соответствующих ферментов, рассматриваются как неблагоприятный фактор, ассоциированный с мутагенными и канцерогенными эффектами (Баранов и др., 2000). Известно, что замена изолейцина на валин в 462-й позиции у носителей варианта 1384G гена *CYP1A1* сопровождается значительным повышением активности фермента (Masson et al., 2005). Однако низкая частота встречаемости аллеля G сайта A1384G (не более 5% для большинства популяций) затрудняет использование этого полиморфизма в ассоциативных исследованиях. В этой связи нами были изучены два сцепленных с ним сайта – T947+242C и T-27+606G, для которых частота минорных аллелей значительно выше. Отметим, что в глобальном проекте HarMap (<http://www.harmap.org/>) данные по сайтам T947+242C и T-27+606G отсутствуют, однако в работе Киселева с соавторами сообщалось о сцеплении сайтов A1384G и T947+242C (Kisselev et al., 2005). Полиморфизм T947+242C не связан с изменением последовательности аминокислот, однако характеризуется увеличенной индуцибельностью фермента у обладателей генотипа T/C и C/C (Meletiadis et al., 2006). Сайт T-27+606G находится в первом интроне локуса *CYP1A1* и характеризуется значительно более высоким уровнем полиморфизма по сравнению с традиционным для ассоциативных исследований сайтом A1384G. Для полиморфизма T-27+606G были получены значимые эффекты в работах по гормонально-зависимым опухолям (Figuroa et al., 2008), при изучении уровня метаболитов половых гормонов, которые являются субстратом для *CYP1A1* (Sowers et al., 2006), в отношении заболеваемости опухолями мозга (Сальникова и др., 2010), а так же в ассоциативных исследованиях по злокачественным новообразованиям легких (Rotunno et al., 2009). В литературе обсуждается вопрос о разнонаправленном влиянии аллельных вариантов -27+606G и -27+606T на регистрируемые эффекты в экологически неблагоприятных условиях

(промышленное загрязнение воздуха, курение) и при отсутствии таковых. В первом случае протективным вариантом является -27+606Т, во втором – -27+606G (Rotunno et al., 2009; Wang et al., 2008). В отношении экспрессии гена наблюдается аналогичная закономерность: у курильщиков экспрессия *CYP1A1* повышена при -27+606G, а у некурящих – при носительстве мажорного аллеля -27+606Т (Rotunno et al., 2009). В настоящей работе увеличение частоты индуцированных хромосомных aberrаций ассоциировано с мажорным вариантом -27+606Т. Исходя из литературных данных, это можно объяснить отсутствием специфической индукции *CYP1A1* при облучении *in vitro* крови здоровых добровольцев. В этом случае большей индуцибельностью, сопряженной с повышенным образованием промежуточных электрофильных метаболитов, обладает вариант -27+606Т.

Однако при изучении последствий постлучевой терапии у детей нами не было выявлено ни отрицательного, ни положительного влияния этого аллеля. В тоже время данные других авторов показывают, что у подростков, проживающих в экологически неблагоприятных условиях в Кемеровской области и подвергающихся комплексному воздействию высоких доз радона, уровень хромосомных aberrаций был выше у обладателей минорных аллелей гена 1 фазы детоксикации ксенобиотиков *CYP1A1* (Минина и др., 2009).

В отношении гена *RAD51* известно, что замена гуанина на цитозин в положении С-98G (rs1801320) приводит к увеличению активности *RAD51* и учащению гомологичной рекомбинации (Nogueira et al., 2011). Известно, что пониженная экспрессия этого гена приводит к гиперчувствительности клетки к ионизирующему излучению. Нами была рассмотрена однонуклеотидная замена, в результате которой происходит увеличение активности данного гена. При повышении экспрессии данного гена возрастает его репарационная активность. Клетки с повышенной экспрессией *RAD51* менее подвержены радиационно-индуцированным транслокациям, чем клетки с нормальной или низкой экспрессией *RAD51* (Grandy et al., 2002). Также в клетках с повышенной экспрессией *RAD51* частота повреждений ДНК и хромосомных aberrаций ниже, чем в клетках с нормальной или низкой экспрессией *RAD51* (Raderschall et al., 2002; Sak et al., 2005).

Клетки с повышенной экспрессией *RAD51* более устойчивы к ионизирующему излучению (Vispé et al., 1998). Данные факты могут объяснить понижение количества дицентриков среди индивидов, имеющих функционально более активный аллель гена *RAD51*.

К сожалению, нам не удалось выявить сходных тенденций в развитии осложнений связанных с проведением лучевой терапии и цитогенетическими изменениями, связанными с облучением клеток здоровых добровольцев *in vitro*. Это может быть связано как с разницей в условиях проведения эксперимента в двух выборках (клетки крови добровольцев облучались *in vitro*, а кровь, собранная у детей прошедших лучевую терапию была облучена *in vivo*). Второй причиной наблюдаемых различий может быть наличие у детей, находящихся на лечении, сопровождающей медикаментозной терапии, хотя врачи считают воздействие сопровождающей терапии при облучении незначительным. Третьей причиной этих отличий может быть возраст испытуемых и различные механизмы начинающие действовать в клетках человека при достижении определенного возраста. Еще одной причиной, способной повлиять на результаты, полученные в выборке облученных детей, является немногочисленность этой выборки.

Заключение

В данной работе на основании литературных данных были отобраны гены, которые могут быть задействованы в развитии заболевания как «гены-модификаторы», а также могут влиять на течение заболевания и скорость его развития, степень злокачественности развивающейся опухоли. Также изученные гены могут определять радиочувствительность организма, а, следовательно, могут влиять на успешность применяемой лучевой терапии.

Из 15 изученных сайтов 11 генов нами были получены эффекты для генов детоксикации ксенобиотиков *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* и гена эксцизионной репарации ДНК *XPB*. Некоторые гены (*XPB*, *MTHFR*, *nNOS*) показали наличие ассоциации с исследуемыми признаками, однако статистически эти результаты оказались не значимы. Показано наличие гендерных различий в ассоциировании

полиморфизма исследуемых аллелей с развитием опухолей мозга у детей. Обнаружены ассоциации полиморфизма исследуемых аллелей с изменением частоты индуцированных *in vitro* аббераций. Выявлены ассоциации полиморфизма исследованных аллелей с развитием осложнений при проведении лучевой терапии, которые оказались не значимыми. Однако ранее такие исследования не проводились.

Поиск маркеров в любых ассоциативных исследованиях всегда осложнен взаимодействиями генотип-среда и ген-генными взаимодействиями. При изучении генетических предпосылок к развитию МФЗ или осложнений связанных с применяемой терапией этот вопрос стоит очень остро, так как в большинстве случаев очень сложно стратифицировать выборки по ряду критериев, которые могут повлиять на развитие патологического состояния. Ситуация осложняется еще и тем что на сегодняшний день не разработаны точные и объективные критерии оценки развития осложнений связанных с терапией.

Таким образом, несмотря на значительную вариабельность эффектов в разных когортах, проведенные, в связи с изучением развития онкопатологии ЦНС, исследования позволили выделить группу полиморфных сайтов генов детоксикации ксенобиотиков с функциональными аллельными вариантами, ощутимо влияющими на развитие такого типа заболеваний. Несмотря на отсутствие ассоциации изучаемых полиморфных сайтов с развитием осложнений при проведении лучевой терапии, необходимо продолжить работу по изучению влияния генов на реакцию организма в связи с применением разных видов терапии, чтобы в дальнейшем использовать полученные данные в целях персонализированной медицины.

Выводы

1. Носители минорного аллеля -27+606G гена *CYP1A1* имеют предрасположенность к заболеванию опухолью мозга в целом (OR=1,67, p=0,009), и, в частности, к глиальными опухолью (OR=1,41, p=0,0077) и к эмбриональными опухолью мозга (OR=2,66, p=0,0026). У гомозигот по делеции гена *GSTM1* повышен риск заболеваемости в отношении опухолей мозга в целом и, в частности, в отношении глиальных и эмбриональных опухолей.
2. У двойных гомозигот по делециям генов *GSTM1* и *GSTT1* повышен риск заболеваемости опухолью мозга в целом и, в частности, глиальными и эмбриональными опухолью.
3. Выявлены гендерные различия: среди мальчиков с возрастом манифестации заболевания до 12 лет гомозиготы по делеции гена *GSTM1* предрасположены к заболеванию опухолью мозга в целом, и в частности глиальными и эмбриональными опухолью (OR=2,09, p=0,0009; OR=2,31, p=0,003 и OR=1,93, p=0,036 соответственно). Среди девочек с возрастом манифестации заболевания до 10 лет носители минорного аллеля -27+606G гена *CYP1A1* имеют склонность к заболеванию глиальными опухолью мозга.
4. Число aberrаций хромосомного типа, индуцированных γ -облучением *in vitro*, понижено у гомозигот G/G по локусу *CYP1A1* T-27+606G по сравнению с носителями аллеля T: $0,094 \pm 0,006$ против $0,112 \pm 0,002$ (p=0,005). Частота дицентриков после облучения понижена у гомозигот G/G по сравнению с носителями аллеля C по гену *RAD 51*: $0,057 \pm 0,002$ против $0,068 \pm 0,004$ (p=0,003).

Список работ, опубликованных в журналах из списка ВАК

1. Сальникова Л.Е., Зелинская Н.И., **Белопольская О.Б.**, Асланян М.М., Рубанович А.В. Ассоциативное исследование генов детоксикации ксенобиотиков и репарации у детей со злокачественными новообразованиями мозга // Acta Naturae. 2010. Т.2. № 4(7).–С.66-74.
2. Асланян М.М., Сальникова Л.Е. , Смелая Т.В., Зелинская Н.И., **Белопольская О.Б.**, Замулаева И.А., Иванова Т.И., Рубанович А.В. Дизруптивный характер ассоциирования генов детоксикации ксенобиотиков с мультифакториальными заболеваниями // Гл. в монографии «Пост-геномные исследования и технологии». Под редакцией чл.-корр. РАН С.Д.Варфоломеева. М. 2011. С. 423-453.
3. Salnikova L., Chumachenko A., **Belopolskaya O.**, Rubanovich A. Correlations between DNA polymorphism and frequencies of gamma-radiation induced and spontaneous cytogenetic damage.// Health Phys. 2012 Jul; 103(1):37-41.

Список тезисов

4. **Белопольская О.Б.** Изучение вклада генов детоксикации и репарации в предрасположенность к развитию рака мозга у детей. // Медицинская генетика. 2010. Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону. 14-18 мая 2010 г. С. 21-22.
5. **Белопольская О.Б.**, Веснина И.Н, Кузнецова Г.И., Кузьмина Н.С, Лаптева Н.Ш., Мязин А. Е., Сальникова Л.Е., Чумаченко А.Г., Рубанович А.В. Оценка селективной значимости и прогноз динамики распространения потенциально опасных аллельных вариантов генов // Материалы конференции «Генофонды и генетическое разнообразие». М. 2010. С.161-163.
6. **Белопольская О.Б.** Вклад генов репарации в предрасположенность к развитию злокачественных новообразований мозга у детей // Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых. Тверь. 3-8 декабря 2012 г. с.212-215.