

УДК 577.2:616-006

^{1,2}Г.С. Жунусова, ³Г.А. Афонин,
¹Б.Б. Жунусбекова, ¹О.А. Иксан, ¹К.Б. Джантаева,
³Д.Р. Кайдарова, ⁴М.И. Паркер, ^{1,2}Л.Б. Джансугурова

¹ Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан.

² Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан.

³ Городской онкологический диспансер УЗ, г. Алматы, Казахстан.

⁴ Международный Центр геномной инженерии и биотехнологии, г. Кейптаун, ЮАР.

*e-mail: gulnur_j@mail.ru

Ассоциация *MLH1-93G>A* полиморфизма с риском развития колоректального рака в казахстанской популяции

В статье приводятся результаты молекулярно-эпидемиологического исследования по выявлению ассоциации полиморфизма *MLH1-93G>A (rs1800734)* с развитием КРП у жителей г. Алматы. Генотипирование этого полиморфизма проведено у 247 больных колоректальным раком и 244 здоровых доноров. Статистический анализ позволил определить достоверную ассоциацию – *-93GG* генотипа с развитием колоректального рака у казахстанцев.

Ключевые слова: колоректальный рак, *MLH1-93G>A* полиморфизм, казахстанская популяция, ПЦР-ПДРФ.

Г.С. Жүнісова, Г.А. Афонин, Б.Б. Жүнісбекова, О.А. Иксан,
 К.Б. Джантаева, Д.Р. Қайдарова, М.И. Паркер, Л.Б. Жансүгірова

Қазақстандық популяциядағы колоректалды обыр дамуының *MLH1-93G>A* полиморфизмімен байланысы

Мақалада *MLH1-93G>A (rs1800734)* полиморфизмінің Алматы қаласы тұрғындарындағы колоректалды обыр дамуы арасындағы байланысын анықтау бойынша молекулалық-эпидемиологиялық зерттеулердің нәтижелері көрсетілген. Бұл полиморфизмді генотиптеу колоректалды обырмен ауыратын 247 науқастар мен 244 сау донорларға жүргізілді. Статистикалық талдау *-93GG* генотиптің қазақстандықтардағы колоректалды обырдың дамуымен нақты байланысын анықтауға мүмкіндік берді.

Кілтті сөздер: колоректалды обыр, *MLH1-93G>A* полиморфизмі, қазақстандық популяция, ПТР-РФПҮ

G.S. Zhunusova, G.A. Afonin, B.B. Zhunusbekova, O.A. Iksan,
 K.B. Djantaeva, D.R. Kaidarova, M.I. Parker, L.B. Djansugurova

Association of *MLH1-93G>A* polymorphism with the risk of colorectal cancer in Kazakhstan population

The results of molecular and epidemiological studies to determine the association of *MLH1-93G>A (rs1800734)* polymorphism with the development of CRC among Almaty residents are presented here. Genotyping of this polymorphism was performed in 247 patients with colorectal cancer and 244 healthy controls. The statistical analysis showed reliable association of *-93GG* genotype with the development of colorectal cancer in Kazakhstan citizens.

Keywords: colorectal cancer, *MLH1-93G>A* polymorphism, Kazakhstan population, PCR-RFLP.

Колоректальный рак (КРП) является одним из наиболее распространенных злокачественных опухолей в мире и заболеваемость КРП растет как в развитых, так и развивающихся странах, включая Казахстан. Ежегодно во всем мире более 1 миллиона человек заболевают КРП [1] и приводит к 0,5 млн. случаев смерти [2]. По дан-

ным КазНИИОиР в Казахстане наблюдается высокий темп прироста заболеваемости: в 2011 г. он составил 6.2% и 3.8% для рака ободочной и прямой кишок, соответственно.

Важную роль в развитии КРП играют факторы окружающей среды и генетическая предрасположенность [3]. Дефекты в системе репарации

ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК (MMR-mismatch repair) могут быть одним из возможных генетических факторов риска в этиологии КРР. Система MMR репарации поддерживает геномную целостность, исправляя ошибки репликации ДНК, ингибируя рекомбинацию между не идентичными последовательностями ДНК, участвуя в реакции на повреждения ДНК. В случае инактивации MMR системы восприимчивость к раку может значительно повыситься [4]. Ген *MutL 1 (hMLH1)* является одним из основных генов в MMR, он расположен на хромосоме 3p21.3 и состоит из 19 экзонов, кодирующих белковый продукт из 756 аминокислот (*GenBank accession no. AC011816*). Помимо распознавания и репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК ген MLH1 также играет важную роль в других жизненно важных клеточных процессах, таких как арест клеточного цикла, окислительный стресс и апоптоз [5, 6].

Однонуклеотидный полиморфизм *MLH1-93G>A (rs1800734)* в промоторном участке регулирует активность промотора и скорость транскрипции гена [7]. В нескольких исследованиях оценивалась взаимосвязь *MLH1-93G>A* полиморфизма с риском КРР [8-11], а также с риском развития других различных видов рака, таких как рак легких [12-13], рак яичников [14], рак эндометрия [15], рак желудка [16], рак молочной железы [17]. Литературные данные о вовлеченности этого вида полиморфизма в развитие КРР еще во многом спорны. Тем не менее, большинство результатов показывают ассоциацию А аллеля. В Казахстане подобные исследования не проводились. В связи с этим, целью настоящей работы явилось проведение исследования методом случай-контроль для выявления возможных ассоциаций *MLH1-93G>A* с развитием КРР в казахстанской популяции.

Материалы и методы

Для случай-контроль исследования на базе Городского онкологического диспансера ДЗ г. Алматы были собраны образцы EDTA-обработанной крови у 247 пациентов с диагнозом КРР. Контрольная группа здоровых людей (244 чел.) подбирались в соответствии к группе больных КРР с учетом возраста, пола, этнического состава и по отношению к курению. Также, контрольная группа не имела биологически родственных связей с пациентами и семейной

истории злокачественных новообразований. Перед забором биоматериала получали добровольное информированное согласие на исследование и проводили подробное анкетирование. Протокол исследования был одобрен Этическим Комитетом Казахского Национального Медицинского Университета им. С.Д. Асфендиярова (Алматы, Казахстан).

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным фенол-хлороформным методом с небольшими модификациями в составе лизирующего буфера (0,2 М ацетата натрия и 1% додецилсульфата натрия, рН 8,0) и осаждали в ледяном 96% этаноле. Количество и качество водных растворов ДНК определяли спектрофотометрически (*Eppendorf BioPhotometer plus*). Выделенные образцы ДНК хранились при -20°C и использовались для дальнейшего анализа.

Генотипирование *MLH1-93G>A* полиморфизма

Генотипирование *MLH1-93G>A* полиморфизма осуществляли методом полимеразной цепной реакции-полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Специфические праймеры для *MLH1-93G>A* полиморфизма были взяты из литературных данных [12]. Реакционная смесь для ПЦР амплификации объемом 20 мкл включала 50-100 нг геномной ДНК образцов, 25 пмоль каждого праймера и PCR Master Mix (2x, *Sigma, Германия*). Условия ПЦР-амплификации были следующими: иницирующий этап – 95° С, 5 мин., затем следовал блок из 36 циклов: 95° С, 30 сек., 58° С, 30 сек. и 72° С, 30 сек.; и этап финальной элонгации – 72° С, 10 мин. 5 мкл каждого ПЦР продукта обрабатывали с 10 ед. *PvuII* рестриктазой (*New England Biolabs, Beverly, MA*) при температуре 37°C в течение ночи, затем продукты рестрикции анализировали в 3% агарозном геле с окраской бромистым этидием и визуализацией фрагментов в проходящем УФ-свете. Гомозиготный AA генотип представлял фрагмент размером 387 п.о., тогда как гомозиготный GG генотип – 2 фрагмента 207 и 180 п.о. Соответственно, гетерозиготный AG генотип в геле проявляется в виде 3 полос (387, 207 и 180 п.о.).

Статистический анализ

Статистический анализ ассоциации *MLH1-93G>A* полиморфизма, выполняли с использова-

нием метода χ^2 в программах *Software GraphPad InStat tm Copyrigh (V. 2.04. Ralf Stahlman, Purdue University)* и «Калькулятора для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль»», представляемой сайтом компании «Тапотили» лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии Государственного Научного Центра Российской Федерации «ТосНИИ генетика». Все статистические тесты были двусторонними и значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

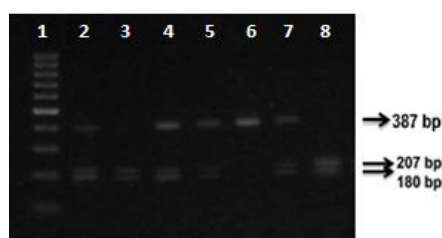
Результаты и их обсуждение

Демографические характеристики исследуемой популяции представлены в таблице 1. Средний возраст пациентов КРР и контрольной группы составил 63.2 ± 11.3 и 62.3 ± 11.4 соответственно.

В толстой и сигмовидной кишке опухоль развивалась у 116 чел. (47.0%), в прямой кишке – у 131 чел. (53.0%). Ранняя стадия (I + II) впервые диагностирована у 98 чел. (39.7%). Стоит отметить высокую долю больных (149 чел. – 60.3%)

Таблица 1 – Демографические характеристики исследуемых популяций

Характеристика	No. (%)	
	случай	контроль
Возраст (год)		
Ранг	29–88	28–88
Среднее значение \pm стандартное отклонение (SD)	63.2 ± 11.3	62.3 ± 11.4
Пол		
Мужчин	116 (47.0)	106 (43.4)
Женщин	131 (53.0)	138 (56.6)
Национальность		
Казахи	69 (28.0)	89 (36.5)
Русские	133 (54.0)	135 (55.3)
Другие	45 (18.0)	20 (8.2)



3% агарозный гель, RvuII обработанные продукты
1–Маркер 100-1000 п.о.; 2, 4, 5, 7 – GA генотип; 3, 8 – GG генотип; 6 – AA генотип.

Рисунок 1 – ПЦР-ПДРФ анализ -93G>A полиморфизма гена *MLH1*.

Таблица 2 – Распределение частоты *MLH1* -93G>A генотипов в изучаемых когортах

Вид полиморфизма	Генотипы	Колоректальный рак, чел (%)	Контроль, чел (%)	OR	CI 95%	χ^2	p
<i>MLH1</i> -93G>A	GG	126	101	1.47	1.03 – 2.11	5.31	0.07
	GA	92	115	0.67	0.46 – 0.95		
	AA	29	28	1.03	0.59 – 1.78		
MLH1 -93G>A Доминантная модель	GG + GA	218	216	0.97	0.56 – 1.69	0.01	0.93
	AA	29	28	1.03	0.59 – 1.78		
MLH1 -93G>A Рецессивная модель	GG	126	101	1.47	1.03 – 2.11	4.57	0.03
	GA + AA	121	143	0.68	0.47 – 0.97		

с впервые регистрируемыми запущенными (III и IV) стадиями заболевания.

Гистологическая верификация клинических диагнозов показала, что в данной группе представлены в основном аденокарциномы: высокодифференцированная – 17 чел. (7.0%); умереннодифференцированная – 159 чел. (64.0%); низкодифференцированная – 32 чел. (13.0%).

Полиморфизм *MLH1-93G>A* был генотипирован в общей сложности у 247 пациентов с КРР и у 244 здоровых людей с помощью метода ПЦР-ПДРФ (рис. 1).

Распределение генотипов *MLH1-93G>A* полиморфизма в среди пациентов и контрольной группе, приведены в таблице 2.

Согласно мультипликативной модели наследования для общей выборки относительный риск более выражен для аллеля -93G (OR=1.24), чем для аллеля -93A (OR=0.81). Влияние -93G аллеля на развитие КРР становится более заметным (таблица 2) в случае гомозиготного генотипа (-93GG), относительный риск развития возраст-зависимых заболеваний достоверно повышается (OR=1.47). Рецессивная модель наследования также достоверно выявляет относительный риск влияния -93GG генотипа против сочетания генотипов -93GA и -93AA (OR= 1.47).

Представленные в литературе результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют, что ассоциированность этого полиморфизма с развитием раковых заболеваний проявляется во многих популяциях [8-17]. Стоит отметить, что в большинстве исследованных популяций -93A аллель проявляет невысокую ас-

социированность с развитием раков легкого, молочной железы, яичников, эндометрия, желудка, печени, лимфомы.

Исследования ассоциации *MLH1-93G>A* в развитие КРР активно ведутся по всему миру. Однако достоверных связей выявлено не так уж много. Изучение многочисленных популяций (около 1000 образцов) больных КРР из Онтарио и Ньюфаундленда показало противоречивые данные о вовлеченности *MLH1-93G>A* полиморфизма в развитие заболевания [9]: в популяции из Онтарио ассоциации не проявляется, однако в популяции из Ньюфаундленда -93AA генотип ассоциирован с КРР (OR=2.22), причем данный генотип в высокой степени был ассоциирован с микросателлитной нестабильностью (для популяции из Ньюфаундленда – OR=8.88, а для популяции из Онтарио – OR=3.23). В популяции малазийцев ассоциированность с развитием КРР проявлял гетерозиготный генотип -93GA (OR=2.2733; p=0.021) [11]. Отмечено, что в популяции азиат-индийцев -93GG генотип в высокой степени ассоциирован с развитием КРР – OR=6.73; p=0.006 [18]. Представленные данные показывают противоречивость выявленных ассоциаций, вероятно, определяемых этнической составляющей.

Суммируя сведения, можно отметить, что, несмотря на множество работ посвященных изучению этого полиморфизма в развитие КРР, вопрос остается малоизученным и требует дальнейшего рассмотрения. В этой связи выявленная нами ассоциация -93GG генотипа с развитием КРР у казахстанцев может представлять определенный интерес.

Литература

- 1 Cunningham D., Atkin W., Lenz H.J., Lynch H.T., Minsky B., Nordinger B., Starling N., Colorectal cancer // Lancet. – 2010. – V. 375 (9719). – P. 1030-1047.
- 2 Merika E., Saif M.W., Katz A., Syrigos K., Morse M., Review. Colon cancer vaccines: an update // In vivo (Athens, Greece). – 2010. – V. 24 (5). – P. 607-628.
- 3 Malekzadeh R., Bishehsari F., Mahdavinia M., Ansari R., Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran // A review. Arch Iran Med, – 2009. – V. 12. – P. 161–169.
- 4 Jean M., Pelletier J., Hilpert M., Belzile F., Kunze R., Isolation and characterization of AtMLH1, a MutL homologue from *Arabidopsis thaliana* // Mol Gen Genet. – 1999. V. 262. -P. 633–642.
- 5 Jiricny J., The multifaceted mismatch-repair system // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – V. 7. – P. 335–346.
- 6 Hardman R.A., Afshari C.A., Barrett J.C., Involvement of mammalian MLH1 in the apoptotic response to peroxide-induced oxidative stress // Cancer Res. – 2001. – V. 61. – P. 1392–1397.
- 7 Perera S., Mrkonjic M., Rawson J.B., Vapat B., Functional effects of the MLH1 –93G>A polymorphism on MLH1/EPM2AIP1 promoter activity // Oncol. Rep. – 2011. – V. 25. – P. 809–815.
- 8 Allan J. M., Shorto J., Adlard J. et al., MLH1 -93G.A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer // Int. J. Cancer. – 2008. V. 123. P. 2456–2459.

9 Raptis S., Mrkonjic M., Green R.C., et al., MLH1 -93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer // *J Natl Cancer Inst.* -2007. – V. 99, – P. 463-474.

10 Muniz-Mendoza R., Ayala-Madrigal M.L., Partida-Perez M., et al., MLH1 and XRCC1 polymorphisms in Mexican patients with colorectal cancer // *Genet Mol Res.* -2012. – V. 11. – P. 2315-2320.

11 Mohd Nizam Z., Abdul Aziz A. A., **Gurjeet K., et al., Contribution of the MLH1 -93G>A Promoter Polymorphism in Modulating Susceptibility Risk in Malaysian Colorectal Cancer Patients** // *Asian Pacific J Cancer Prev.* – 2013. – V. 14 (2), – P. 619-624.

12 Park S. H., Lee G. Y., Jeon H. S. et al., -93G->A polymorphism of hMLH1 and risk of primary lung cancer // *Int. J. Cancer.* – 2004. – V. 112. – P. 678–682.

13 Shih C. M., Chen C. Y., Lee I. H., Kao W. T., Wang Y. C., A polymorphism in the hMLH1 gene (-93G→A) associated with lung cancer susceptibility and prognosis // *Int. J. Mol. Med.* – 2010. – V. 25. – P. 165–170.

14 Harley I., Rosen B., Risch H. A., et al., Ovarian cancer risk is associated with a common variant in the promoter sequence of the mismatch repair gene MLH1 // *Gynecol. Oncol.* – 2008. – V. 109. – P. 384–387.

15 Beiner M. E., Rosen B., Fyles A., Harley I., Pal T., Siminovitch K., Zhang S., Sun, P. and Narod, S. A., Endometrial cancer risk is associated with variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Preven.* – 2006. – V. 15. – P. 1636–1640.

16 Deng D. J., Zhou J., Zhu B. D., Ji J. F., Harper J. C., Powell S. M., Silencing-specific methylation and single nucleotide polymorphism of hMLH1 promoter in gastric carcinomas // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – V. 9. – P. 26–29.

17 Lee K. M., Choi J. Y., Kang C. et al., Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – P. 4620–4626.

18 Jha R., Gaur P., Sharma S.C., Das S. N. Single nucleotide polymorphism in hMLH1 promoter and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk Asian Indians // *Gene.* – 2013. In print.