

С. Б. Мельнов¹, Е. Г. Смирнова¹, А. А. Мохорт²

¹ *Международный государственный экологический институт имени А.Д.Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь*

² *Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н.Н. Александрова, г. Минск, Республика Беларусь*

ВКЛАД ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ГЕНА VHL И ГЕНОВ СИСТЕМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ В ГЕНЕЗ РАКА ПОЧКИ

В статье проведен анализ данных по некоторым молекулярно-генетическим изменениям при раке почки, а также приводятся предварительные результаты исследования по выявлению распространенности мутаций в гене VHL и полиморфных вариантов генов системы детоксикации ксенобиотиков при раке почки у мужского населения Республики Беларусь.

➤ **Ключевые слова:** *рак почки, молекулярно-генетические нарушения, ген VHL, гены системы детоксикации ксенобиотиков, полиморфизм генов.*

Введение

По данным Белорусского канцер-регистра, Беларусь относится к странам с высоким уровнем заболеваемости раком почки (РП). На долю этой патологии в структуре всех злокачественных новообразований в РБ в 2012 году приходилось 4,6% случаев и в настоящее время прослеживается тенденция к устойчивому росту заболеваемости (12,0 случаев на 100 000 населения в 2008 г. и 13,7 на 100 000 в 2013 г.) [1].

Факторы риска развития рака почки включают курение, избыточную массу тела и высокое кровяное давление; кроме того установлено, что у мужчин данное заболевание встречается в 2 раза чаще, чем у женщин [2]. Однако, оценка популяционного риска для рака почки, проведенная в США показала, что в 50% случаев причины заболевания остаются невыясненными и предполагается, что исследование генетических нарушений может внести вклад в установление этиологии РП [3].

В настоящее время известно, что рак почки – гетерогенная группа опухолей, различающихся гистологической картиной, особенностями клинического течения и разной реакцией на терапию, а также выживаемостью пациентов, что дает основание считать генетический фактор доминирующим в развитии различных типов рака [4, 5].

Приоритетным направлением является выявление генетических нарушений, характерных для ряда наследственных синдромов (синдром Фон Хиппель-Линдау, синдром Берта-Хогга-Дьюбе, наследственная папиллярная карцинома 1-го типа, наследственная парагангиома и другие), которые наследуются, главным образом, по аутосомно-доминантному типу и одним из их проявлений является рак почки [6]. Доля таких форм в структуре заболеваемости раком почки составляет 3–4%, однако, изучение особенностей генетических нарушений, лежащих в их основе, важно для понимания молекулярных механизмов, ответственных за развитие спорадических форм РП [7].

Особый интерес представляет синдром Хиппель-Линдау, характеризующийся наличием опухолей различной локализации (гемангиобластом центральной нервной системы, ангиом сетчатки, феохромоцитом, карцином почки, рака поджелудочной железы и др.), т. к. нарушения в гене *VHL*, обуславливающие данное заболевание, выявляются и в большинстве случаев спорадического светлоклеточного рака почки [6, 8].

Известно, что особое значение в развитии злокачественных новообразований имеет процесс неоангиогенеза. В канцерогенезе светлоклеточных карцином ключевым событием часто является инактивация гена *VHL*, что приводит к аномальной продукции многих факторов роста, в том числе способствующих усилению ангиогенеза. Белок *VHL* входит в состав E3 убиквитин лигазы, которая в условиях нормальной оксигенации способствует присоединению убиквитина к транскрипционным факторам (hypoxia-inducible factor – HIF) и их протеасомной деградации [9]. Инактивация гена *VHL* приводит к накоплению HIF-1 α и HIF-1 β в клетках и изменению транскрипции ряда генов. Критические гены, активируемые HIF, включают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF-R), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий

фактор роста альфа ($TGF\alpha$), карбоангидразы IX (CA-IX) и ряд других [10], что в свою очередь, стимулирует ангиогенез, пролиферацию клеток и усиленный рост опухоли.

Вместе с тем, около 40% спорадических светлоклеточных карцином почки развиваются без ранней инактивации *VHL*, а в качестве инициирующих событий канцерогенеза выступают нарушения других путей регуляции клеточной пролиферации [11].

К часто встречающимся изменениям в большинстве опухолей эпителиального происхождения относят делеции на коротком плече хромосомы 3 (включая 3p12, 3p14, 3p21 и 3p24-25) [12].

В настоящее время очевидна роль в канцерогенезе эпигенетических факторов, изменяющих экспрессию гена. К таким факторам относят аномальное метилирование CpG-островков в промоторных районах ряда генов-супрессоров, участвующих в регуляции таких процессов, как апоптоз, ангиогенез, дифференцировка, что приводит к их полной инактивации [13]. Как было отмечено [12], аберрантное метилирование часто приводит к инактивации генов-супрессоров *VHL*, *RASSF1*, *FHIT*, *SFRP1*, *CDH1* и наблюдается в 85% первичных почечно-клеточных карцином.

Известно, что ключевая роль в поддержании стабильности генома отводится гену *TP53*, частота мутаций в котором при РП колеблется в широких пределах. Рядом авторов отмечается увеличение частоты выявления мутаций *TP53* по мере прогрессирования РП, что может служить предпосылкой для исследования мутаций *TP53* в качестве маркера опухолевой прогрессии [14, 15].

В литературе имеются сведения о корреляции между инактивацией гена-супрессора *PTEN* и прогрессированием РП, а также снижением выживаемости пациентов: так, смертность среди пациентов с инактивированным *PTEN* была в 2 раза выше, чем у пациентов с сохраненной функцией этого гена [16]. Отдельного внимания заслуживает наследственный синдром, связанный с герминальной мутацией гена *PTEN* – синдром Коудена. В одном из исследований проведенном среди 24 пациентов с данным заболеванием, описывается 4 случая почечно-клеточного рака (16,7%): 3 пациента имели одиночные опухоли (2 папиллярные типа I и 1 светлоклеточную), тогда как у четвертого были обнаружены двусторонние хромофобные опухоли. Ни один из пациентов не имел в семейном анамнезе почечно-клеточного рака. Потеря гетерозиготности *PTEN* была выявлена в 4 опухолях [17].

Известно, что в канцерогенезе имеет место нарушение ряда генов, в том числе и ответственных за метаболизм и инактивацию ксенобиотиков. Так, были выявлены статистически значимые ассоциации между полиморфными вариантами гена *CYP1A1* rs1048943 (с.1384A > G, p.Ile462Val) и развитием РП, связанные с повышением активности фермента, а, следовательно, с более высокой интенсивностью формирования реакционных эндогенных метаболитов, способных повреждать ДНК [18].

Особую роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков играют глутатион-S-трансферазы (GST). Различия в составе изоферментов обуславливают разную степень предрасположенности к онкологическим заболеваниям под влиянием мутагенных факторов. Так, гомозиготная делеция и патологический генотип 0/0 генов *GSTM1* и *GSTT1*, а также вариантный генотип (Ile105Val) гена *GSTP1*, приводят к снижению детоксицирующей функции ферментов.

Тем не менее, рядом исследователей не выявлена связь *GSTT1* (0), *GSTM1*(0) и *GSTP1* (м) с повышенным риском РП [19], за исключением *GSTT1* в азиатской популяции [20]. Однако, все авторы едины во мнении, что определенные комбинации полиморфизмов увеличивают риск РП. Так, ассоциации *GSTM1*(0), *GSTT1*(0) и *GSTP1* (AG / GG) приводят к 4,5-кратному увеличению риска РП [21]; играют роль и другие комбинации: *GSTM1* (+) и *GSTT1* (+) у субъектов, подвергающихся воздействию пестицидов; а также *GSTT1*(0) и *GSTP1*(м). Однако возможная роль полиморфизмов генов *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* в этиологии РП недостаточно изучена, а данные весьма неоднозначны [22].

Целью настоящей работы является выявление наиболее распространенных мутаций в специфических для рака почки генах, а также оценка роли полиморфных вариантов генов системы детоксикации ксенобиотиков при раке этой локализации у мужского населения Республики Беларусь.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили 32 образца опухолевой ткани почки, которые были предоставлены РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

При анкетировании больных с РП в 50% случаев установлена наследственная отягощенность по онкологическим заболеваниям (наличие злокачественных новообразований различной локализации, преимущественно желудочно-кишечного тракта у родственников 1–2 линии родства). Однако, объем проанкетированной когорты недостаточен для окончательных выводов, а результаты носят ориентировочный характер.

Геномную ДНК из замороженных образцов выделяли перхлоратным методом. Определение концентрации ДНК проводилось при помощи спектрофотометра The NanoDrop® ND-1000, Peqlab с помощью оригинального программного обеспечения ND-1000 V.3.3.0.

Делеции в 1-ом и 3-ем экзонах гена *VHL* определяли с помощью ПЦР, для чего были подобраны 2 пары праймеров: F1 5'-CCCTACCCAACGCTGCC-3' и R1 5'-GCTTCAGACCGTGCTATCGT-3'; F2 5'-TGGTTTTTGGCCTTCCAGTG-3' и R2 5'-GTAGAGCGACCTGACGATGT-3' и оптимизирована методика.

ПЦР проводилась на амплификаторе Primus 96 (Peqlab, EU) по следующему протоколу: программа амплификации предусматривала 5 мин. предварительной денатурации при 95 °С и 35 циклов: 95 °С – 30 с., 57 °С – 40 с., 72 °С – 10 мин. Детекцию ПЦР-продуктов проводили методом электрофореза в 10% ПААГ.

Выявление делеционного полиморфизма *GSTT1* (генотип (0/0)) проводилось методом аллель-специфической ПЦР. Детекцию продуктов проводили при помощи электрофореза в 2% агарозном геле.

Полиморфизм p.I105V гена *GSTP1* определяли методом ПДРФ с использованием рестриктазы HruSN4IV. Размер ампликонов (рестриктов), п.о.: AA (455), AG (213,242,455), GG (213,242). Детекцию продуктов проводили при помощи электрофореза в 2% агарозном геле.

Результаты

В результате проведенных исследований в 1-ом экзоне гена *VHL* выявлены 2 делеции и 1 гетерозиготное состояние, что составило 9,4%. На рис. 1 представлен результат электрофореза, гетерозиготное состояние в образце № 20 (M 100 – маркер молекулярного веса).

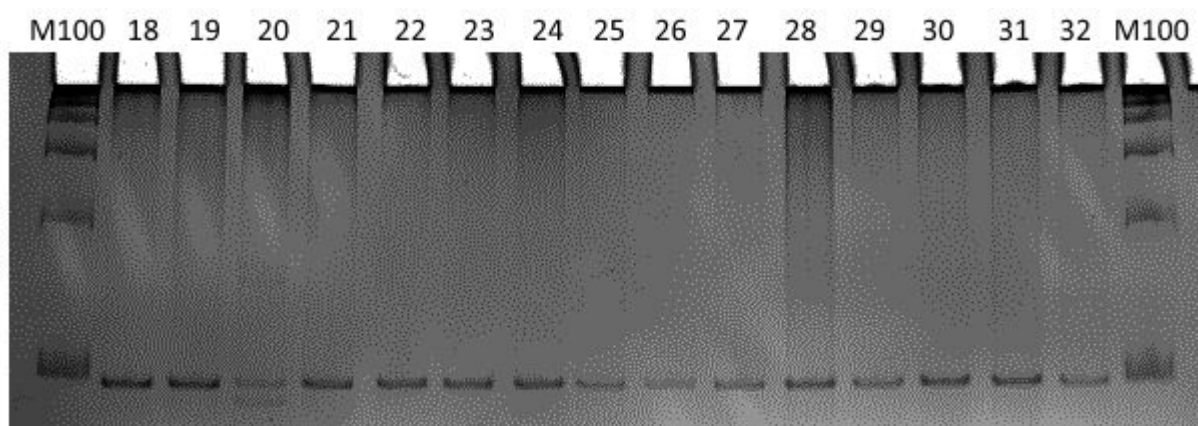


Рисунок 1 – Электрофорез в 10% ПААГ, ген *VHL* (1-й экзон), образцы 18–32

В 3-м экзоне нарушений не выявлено. По данным разных авторов частота соматических мутаций гена *VHL* варьирует от 17 до 71% [12, 18], в настоящем исследовании планируется изучение 2-го экзона, поэтому приведенные результаты носят предварительный характер.

Делеции в гене *GSTT1* выявлены в 28,9±8,01% случаев. На рис. 2 представлен результат электрофореза, делеции в образцах № 3, 9, 10, 12, 13, 15.

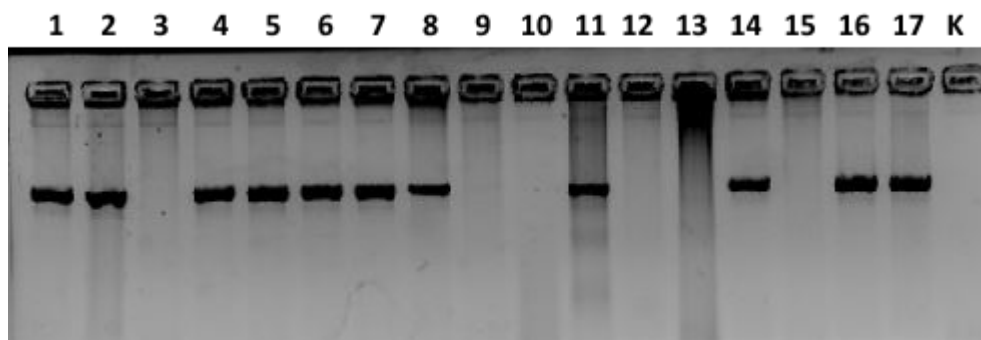


Рисунок 2 – Электрофорез в 2% агарозном геле, ген *GSTT1*, образцы 1-17

При исследовании полиморфизма гена *GSTP1* (Pе105Val) гетерозиготное состояние (генотип AG, Пе/Val) выявлено в 38,4% образцах, остальные случаи – гомозиготы (генотип AA, Пе/Пе). Результаты электрофоретического разделения продуктов в 10 % ПААГ представлены на рис. 3, М – маркер молекулярного веса 50 п. о.

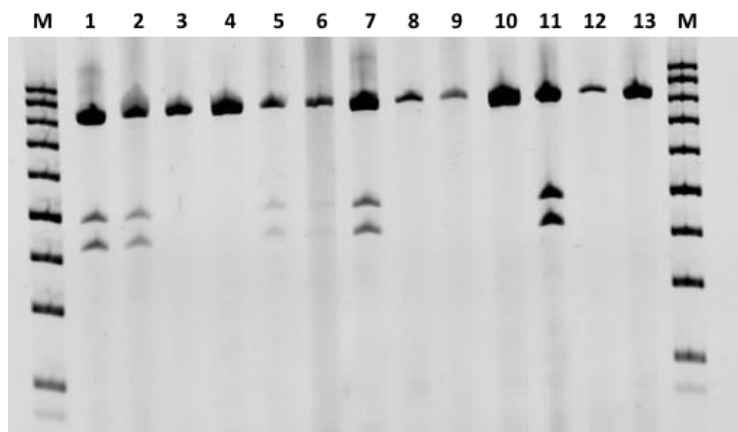


Рисунок 3 – Результаты электрофоретического разделения продуктов гена *GSTP1* в 10 % ПААГ (гетерозиготное состояние в образцах 1, 2, 5, 7, 11).

Ни в одном из исследованных образцов не было выявлено случаев сочетания 2-х полиморфных вариантов генов *GSTT1* и *GSTP1*.

Заключение

Исследование молекулярно-генетических нарушений при онкологических заболеваниях в настоящее время является приоритетным направлением, которое позволит не только выяснить механизмы канцерогенеза, но и определить прогноз заболевания и тактику лечения. В настоящее время в лечении метастатического рака почки все чаще используются таргетные препараты, и определение статуса *VHL* может служить дополнительным тестом при их выборе [6, 15].

Таким образом, изучение особенностей рака почки на молекулярно-генетическом уровне позволит не только усовершенствовать тест-системы для лабораторной диагностики и прогноза течения заболевания, но и, учитывая низкую чувствительность данной патологии к лучевой и химиотерапии, внесет вклад в определение тактики лечения.

Результаты наших исследований позволяют предположить, что наиболее распространенным типом изменений являются изменения в 1-ом экзоне гена *VHL*. В то же время, по генам системы детоксикации ксенобиотиков существенных изменений отмечено не было, что позволяет сконцентрировать дальнейшие исследования на анализе гена *VHL*.

Список литературы

1. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2003-2012) / А. Е. Океанов, П. И. Моисеев, Л. Ф. Левин под ред. О.Г. Суконко – Минск: РНПЦ ОМР им. Александрова, 2013. – С. 146.
2. World Health Organization Classification of Tumours / J.N. Eble [et al.] // Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. – IARC Press, Lyon. – 2004. – Pp. 12–13.
3. Population attributable risk of renal cell cancer in Minnesota / J. Benichou [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 1998. – Pp. 424–430.
4. Linehan, W. M. The genetic basis of cancer of the kidney / W. M. Linehan, M. M. Walther, B. J. Zbar // Urol. – 2003. – Vol. 170. – Pp. 2163–2172.
5. Histopathology of surgically treated renal cell carcinoma: survival differences by subtype and stage / K. A. Keegan [et al.] // J Urol. – 2012. – Vol.188(2). Pp. 391–397.
6. Михайленко, Д. С. ДНК диагностика наследственного рака почки / Д. С. Михайленко, Л. Н. Любченко, Д. В. Залетаев // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Ежеквартальный научно-практический журнал по онкологии. – 2010. – Т. 21. – № 2 (80). – С. 10–17.
7. Renal cancer in von Hippel-Lindau disease and related syndromes / B. Bausch [et al.] // Nat Rev Nephrol. – 2013. – Vol.9(9). – Pp. 529–538.
8. Gossage, L Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma / L. Gossage, T. Eisen // Nat Rev Clin Oncol. – 2010. – Vol.7, № 5. – Pp. 277–288.
9. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma / W. G. Kaelin // Clin Cancer Res. – 2007. – Vol. 15;13(2 Pt 2). – Pp. 680–684.
10. Arjumand, W. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma / W. Arjumand, S.Sultana // Tumour Biol. – 2012. – Vol. 33(1). – Pp. 9-16.

11. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma / Y. Sato [et al.] // *Nat Genet.* – 2013. – Vol. 45(8). – Pp. 860–867.
12. Михайленко, Д. С. Анализ молекулярно-генетических нарушений, ассоциированных с развитием злокачественных новообразований почки : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.15 / Д. С. Михайленко ; Москва, 2008. – 24 с.
13. Аномалии метилирования в процессах канцерогенеза: поиск новых генов, разработка методов и систем ДНК-маркеров для диагностики / Д.В. Залетаев [и др.] // *Экологическая генетика.* – 2011. – ТОМ IX. – № 3. – С.27–31.
14. Онкомаркеры при опухолях почечной паренхимы / С.Х. Аль-Шукри [и др.] // *Нефрология.* – 2006. – Т. 10. – № 1. – С. 77–85.
15. Факторы апоптоза и пролиферации при раке почки / О.Б. Лоран [и др.] // *Онкоурология.* – 2008 – № 2. – С. 16–21.
16. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis / M. Velickovic [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2002. – Vol. 15. – Pp. 479–485.
17. Germline PTEN Mutation Cowden Syndrome: An Underappreciated Form of Hereditary Kidney Cancer / Brian Shucha [et al.] // *The Journal of Urology.* – 2013. – Vol. 190. – Issue 6. – Pp. 1990–1998.
18. Кутлыева, Л. Р. Молекулярно-генетическое изучение рака почки в Республике Башкортостан : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.15 / Л. Р. Кутлыева ; Уфа. – 2013. – 24 с.
19. Glutathione S-Transferase Polymorphisms (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and Their Susceptibility to Renal Cell Carcinoma: An Evidence-Based Meta-Analysis / Yang Xingliang [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol.6. – № 5. – Pp. 6382–7.
20. Relationship between GSTM1/GSTT1 null genotypes and renal cell carcinoma risk: a meta-analysis / H.Y. Cheng [et al.] // *Ren Fail.* – 2012. – Vol. 34(8). P.1052–1057.
21. Impact of glutathione transferase M1, T1, and P1 gene polymorphisms in the genetic susceptibility of North Indian population to renal cell carcinoma / ST Ahmad [et al.] // *DNA Cell Biol.* – 2012. – Vol.31. – № 4. – P. 636.–643.
22. Association of glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms with renal cell carcinoma: evidence from 11 studies / C.Y. Jia [et al.] // *Tumour Biol.* – 2014. – Vol. 35. – Issue 4. – Pp. 3867-3873.

S. B. Melnov, E. G. Smirnova, A. A. Mokhort

CONTRIBUTION OF THE GENETIC MODIFICATION OF VHL GENE AND THE GENES OF THE SYSTEM OF XENOBIOTICS DETOXIFICATION INTO RENAL CANCER GENESIS

The paper analyzes the data on some molecular genetic changes in renal cancer as well as the preliminary results of the study to identify the prevalence of mutations in the VHL gene and polymorphic variants of the genes of the system of xenobiotics detoxification in renal cancer in the male population of the Republic of Belarus.