

На правах рукописи

БУРДЕННЫЙ АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В
РАЗВИТИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО.**

03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

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

Москва – 2013

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние десятилетия частота онкологических заболеваний неуклонно растет. Ежегодно более 10 млн. человек во всем мире заболевают раком и около 6 млн. человек умирают от рака ежегодно, что составляет 12% от умерших во всем мире. Только 5-10% случаев рака являются наследственными, а остальные случаи рака являются результатом генетических и эпигенетических повреждений, возникающих в течение жизни в соматических клетках. Повреждения могут происходить либо вследствие воздействия внешних факторов (курения, радиации, алкоголя), либо внутренних (гормоны, иммунная система).

В структуре онкологической заболеваемости на рак легкого, в том числе и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), приходится около 13% и показатели 5-летней выживаемости очень плохие, даже в странах с высоким уровнем здравоохранения они составляют всего 15% (*Jemal et al., 2010*). В России ежегодно от НМРЛ погибает около 60000 человек, что составляет более 20% всех умерших от злокачественных опухолей. Считается, что причиной этих новообразований является курение (*Имянитов, 2006*).

В развитых странах рак молочной железы (РМЖ) выявляется у каждой десятой женщины, смертность при этом доходит до 40%. В отличие от рака легкого, для рака молочной железы не удалось убедительно выявить факторы риска окружающей среды. Предполагается, что в этом случае на первый план выходят факторы, участвующие в поддержании геномной стабильности (*Имянитов et al., 2004*).

Согласно современным представлениям, важную роль в процессе канцерогенеза играют не только генетические факторы, определяющие индивидуальные различия ферментных систем (*Ревазова и др., 2006*), но и эпигенетические факторы – метилирование промоторных районов генов (*Ходырев и др., 2011*). Изменение статуса метилирования промоторных районов генов является характерной чертой опухолевых клеток, причем аномальное метилирование наблюдается уже на ранних этапах канцерогенеза. Изменения в уровне метилирования промоторных районов генов *MGMT* и *RASSF1A* показаны для рака молочной железы, легкого и опухолей других локализаций.

Генетические и эпигенетические факторы предрасположенности к развитию

онкологических заболеваний связаны с несколькими уровнями системы клеточной защиты. К первому уровню можно отнести гены биотрансформации ксенобиотиков, главным образом, гены глутатион-S-трансфераз *T1*, *M1*, *P1* (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*) (Мартов и др., 2010; Корчагина и др., 2011). Следующий уровень клеточной защиты связан с механизмами прямой репарации повреждения ДНК и на этом уровне важным геном является O(6)-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (*MGMT*) (Степанов и др., 2010; Пономарева и др., 2011). Третий уровень связан с генами, осуществляющими контроль за пролиферацией и дифференцировкой клеток, к ним относятся ген *TP53* со своим регуляторным геном *MDM2* (Желтухин и др., 2010), а также ген-супрессор опухолевого роста *RASSF1A*.

В данном исследовании сделана попытка объединить два аспекта в изучении проблемы повреждения генома человека - нарушение статуса метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* и генетический полиморфизм систем клеточного контроля и детоксикации ксенобиотиков, применительно к генам, кодирующим ключевые ферменты этих систем - *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *TP53* и *MDM2*. При этом, чтобы подчеркнуть универсальность участия данных ферментов в онкологических процессах, были выбраны две принципиально различные по механизмам развития онкопатологии – немелкоклеточный рак легкого и рак молочной железы.

Цель исследования: Изучить вклад метилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT*, а также полиморфных маркеров генов *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *TP53* и *MDM2* в патогенез немелкоклеточного рака легкого и рака молочной железы.

Задачи исследования:

1. Оценить распределение генотипов полиморфных маркеров генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*) и генов контроля пролиферации клеточного цикла и апоптоза (*TP53*, *MDM2*) у больных злокачественными новообразованиями разных локализаций (немелкоклеточный рак легкого и рак молочной железы).
2. Провести сравнительный анализ комбинаций генотипов генов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *TP53*, *MDM2* у всех обследованных больных и выявить специфические сочетания, предрасполагающие к развитию немелкоклеточного рака легкого и рака молочной железы.
3. Определить профили метилирования промоторных областей генов *RASSF1A*,

MGMT в эпителиальных опухолях молочной железы и легкого. Выявить возможные корреляции между уровнем метилирования этих генов и прогрессией опухоли.

4. Подобрать информативные системы маркеров, оптимальные для выявления данных видов опухолей.

Научная новизна: В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование ассоциации генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков, репарации ДНК и регуляции клеточного цикла и апоптоза с патогенезом онкологических заболеваний различных локализаций и выявлена связь неблагоприятных сочетаний генотипов с риском развития опухоли определенной локализации, ее клинко-гистологическими особенностями. Также впервые получены данные об уровне ассоциации комбинаций генотипов генов, кодирующих ферменты биотрансформации ксенобиотиков и гена белка-онкосупрессора p53 с развитием злокачественных новообразований. Получены новые данные об ассоциации глутатион-S-трансфераз и генов *TP53* и *MDM2* с патогенезом НМРЛ и РМЖ. Впервые выявлена ассоциация предрасполагающих генотипов генов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *TP53* и *MDM2* и их сочетания с гистологическим типом опухоли. Впервые получены данные об ассоциации сочетанных предрасполагающих генотипов генов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *TP53*, *RASSF1A* и *MGMT* с патогенезом РМЖ. Впервые обосновано, что суммарное влияние функционально неполноценных вариантов генов глутатион-S-трансфераз T1, M1, P1 и предрасполагающих генотипов генов *TP53* и *MDM2* превышает эффект индивидуальных генотипов. Проведен анализ молекулярно-генетических нарушений, определяющих различия молекулярного патогенеза НМРЛ и РМЖ.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные по итогам проведенного исследования данные фундаментального характера об ассоциации полиморфных маркеров генов, кодирующих ферменты биотрансформации ксенобиотиков (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*), и генов, участвующих в регуляции клеточного цикла и апоптоза (*TP53* и *MDM2*), а также анализ сочетанных предрасполагающих генотипов этих генов в эпителиальных опухолях, существенно расширяют имеющиеся представления о молекулярно-генетических механизмах возникновения и развития злокачественных новообразований.

Установление роли исследованных генов в развитии злокачественных опухолей обосновывает возможность рекомендовать определение этих показателей в качестве диагностических параметров для выявления групп повышенного онкологического риска. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки новых патогенетически оправданных подходов к профилактике и ранней диагностике онкологических заболеваний, а также прогнозированию клинического течения злокачественных опухолей.

Апробация работы. Апробация диссертационной работы состоялась на заседании Секции молекулярной биологии Учёного совета ФГУП «ГосНИИгенетика» 22 мая 2013 года. Результаты настоящей работы были представлены на конференциях: «4th International Conference for Young Scientists 2011 “Molecular biology: advances and prospectives”» (Ukraine, Kiev, 2011), «Актуальные проблемы онкогенетики» (Москва, 2011), XV Российский онкологический конгресс (Москва, 2011), «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2012), «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации, 7 материалов конференций и конгрессов, 1 статья в зарубежном сборнике.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 126 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы), описания результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 325 источников. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 25 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выборка образцов.

Образцы опухолевой и прилежащей гистологически нормальной ткани, а также крови собраны и клинически охарактеризованы в РОНЦ РАМН. Использовали кровь

и ткани только тех больных, которые до операции не получали химио- или лучевую терапию. Из исследования были исключены больные с обострением хронических воспалительных процессов, аутоиммунными заболеваниями, наследственными и психическими болезнями. Все случаи НМРЛ и РМЖ классифицированы клинически по системе TNM в соответствии с требованиями Международного противоракового общества (UICC, версия 7, 2009 г. (*Sobin et al., 2009*)) и типированы гистологически в отделе патоморфологии опухолей НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ РАМН. Выборка парных тканевых образцов включала образцы немелкоклеточного рака легкого 49 случаев (в т.ч. плоскоклеточный рак легкого – 29 случаев и аденокарциному легкого – 20 случаев) и 58 образцов рака молочной железы (преимущественно «протоковой» гистологии, ипРМЖ). Выборка образцов ДНК, выделенная из периферической крови, включала образцы немелкоклеточного рака легкого – 88 случаев (плоскоклеточный рак – 59 случаев, аденокарцинома – 29 случаев) и образцы рака молочной железы – 140 случаев (в т.ч. инфильтративный протоковый – 105 случаев, инфильтративный дольковый – 35 случаев). В качестве популяционного контроля использовали сопоставимую по возрасту и полу выборку онкологически здоровых индивидов (n=240). Также были использованы 10 образцов ткани легкого и 10 образцов ткани молочной железы от постмортальных лиц без выявленных онкопатологий (по данным анамнеза), полученных в патологоанатомическом отделе НИИ Скорой Помощи им. Склифосовского. Далее постмортальные лица без онкопатологии в анамнезе будут обозначены как доноры.

Методы исследования

Выделение геномной ДНК осуществляли по стандартному протоколу (*Sambrook et al., 1989*). Для анализа полиморфных маркеров генов *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *TP53* и *MDM2* использовали метод ПЦР-ПДРФ. Анализ метилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT* проводили с помощью бисульфитной конверсии ДНК с последующей метил-специфичной ПЦР. Наличие участка метилирования определяли по присутствию на электрофореграмме участков, длиной 169 п.н. для гена *RASSF1A* и 81 п.н. для гена *MGMT*, контролем амплификации служило обязательное наличие на электрофореграмме фрагмента ДНК такой же длины, соответствующее неметилированной области гена.

Для статистической обработки данных использовался пакет программ STATISTICA® 6.0. Для сравнения частот метилирования нами использовался точный критерий Фишера. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. При сравнении частот генотипов использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации с риском развития НМРЛ и РМЖ. Связь с клинико-гистологическими параметрами опухоли.

Ферментами второй фазы биотрансформации ксенобиотиков являются глутатион-S-трансферазы (GSTs). Наиболее значимыми генами в своих классах с точки зрения генетических и биомедицинских исследований являются гены *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* (Nebert and Vasiliou, 2004). У носителей “нулевых генотипов” (-/-) генов *GSTM1* и *GSTT1*, синтез соответствующих ферментов полностью отсутствует (Rotunno et al., 2012). У носителей аллеля *Val* полиморфного маркера *Ile105Val* гена *GSTP1* имеет место снижение концентрации фермента в клетках.

Частоты генотипов полиморфных маркеров генов *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* в обследованных группах больных НМРЛ и РМЖ представлены в табл. 1. Частота нулевого (-/-) генотипа гена *GSTT1* в исследованных группах больных НМРЛ и его гистологических подтипах – АК и ПРЛ была достоверно выше, чем в контрольной группе в 2,5 ($\chi^2 = 14,18$), 3,2 ($\chi^2 = 15,71$) и 2,3 раза ($\chi^2 = 9,65$), соответственно (рис. 1А). Полученные нами данные согласуются с данными других авторов (Timofeeva et al., 2010; Dzian et al., 2012). Для рака молочной железы и его инфильтративно-протоковой формы (ипРМЖ) было выявлено увеличение частоты нулевого генотипа гена *GSTT1* в 1,5 раза ($\chi^2 = 6,39$ и $\chi^2 = 7,22$, соответственно) по сравнению с аналогичным показателем у здоровых лиц (рис. 1А). В популяционных исследованиях зарубежных ученых отмечена ассоциация этого гена только с развитием рака молочной железы (Naushad et al., 2011, Ramalhinho et al., 2011).

Таким образом, проведенные нами исследования делеционного полиморфного маркера гена *GSTT1* свидетельствуют, что наличие генотипа (-/-) гена *GSTT1* является фактором риска рака для всех изученных нами опухолей.

Таблица 1.

Распределение частот генотипов полиморфных маркеров генов биотрансформации – *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*, а также полиморфных маркеров генов апоптоза – *TP53* и *MDM2* среди больных НМРЛ и РМЖ, их гистологических подтипов и здоровых индивидов.

Контроль n = 138	ипРМЖ n = 105	идРМЖ n = 35	РМЖ n = 140	Генотип	Ген	Генотип	НМРЛ n = 88	АК n = 29	ПКР n = 59	Контроль n = 160
0,710	0,543	0,571	0,564	(+/+)	<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,659	0,552	0,678	0,863
0,290	0,457*	0,429	0,436	(-/-)		(-/-)	0,341	0,448	0,322	0,138
0,616	0,524	0,371	0,493	(+/+)	<i>GSTM1</i>	(+/+)	0,591	0,517	0,576	0,575
0,384	0,476	0,629	0,507	(-/-)		(-/-)	0,409	0,483	0,424	0,425
0,500	0,410	0,343	0,357	<i>Ile/Ile</i>	<i>GSTP1</i>	<i>Ile/Ile</i>	0,330	0,241	0,373	0,500
0,406	0,467	0,371	0,464	<i>Ile/Val</i>		<i>Ile/Val</i>	0,489	0,552	0,458	0,350
0,094	0,124	0,286	0,179	<i>Val/Val</i>		<i>Val/Val</i>	0,182	0,207	0,169	0,150
0,384	0,124	0,086	0,129	<i>Arg/Arg</i>	<i>TP53</i>	<i>Arg/Arg</i>	0,261	0,241	0,288	0,406
0,312	0,448	0,429	0,421	<i>Arg/Pro</i>		<i>Arg/Pro</i>	0,432	0,345	0,458	0,519
0,304	0,429	0,486	0,450	<i>Pro/Pro</i>		<i>Pro/Pro</i>	0,307	0,414	0,254	0,075
0,971	0,933	0,914	0,943	<i>T/T</i>	<i>MDM2</i>	<i>T/T</i>	0,875	0,828	0,847	0,975
0,029	0,067	0,086	0,057	<i>T/G</i>		<i>T/G</i>	0,125*	0,172	0,153	0,025

*Жирным шрифтом выделены частоты предрасполагающих генотипов, показавших ассоциацию (p<0.05)

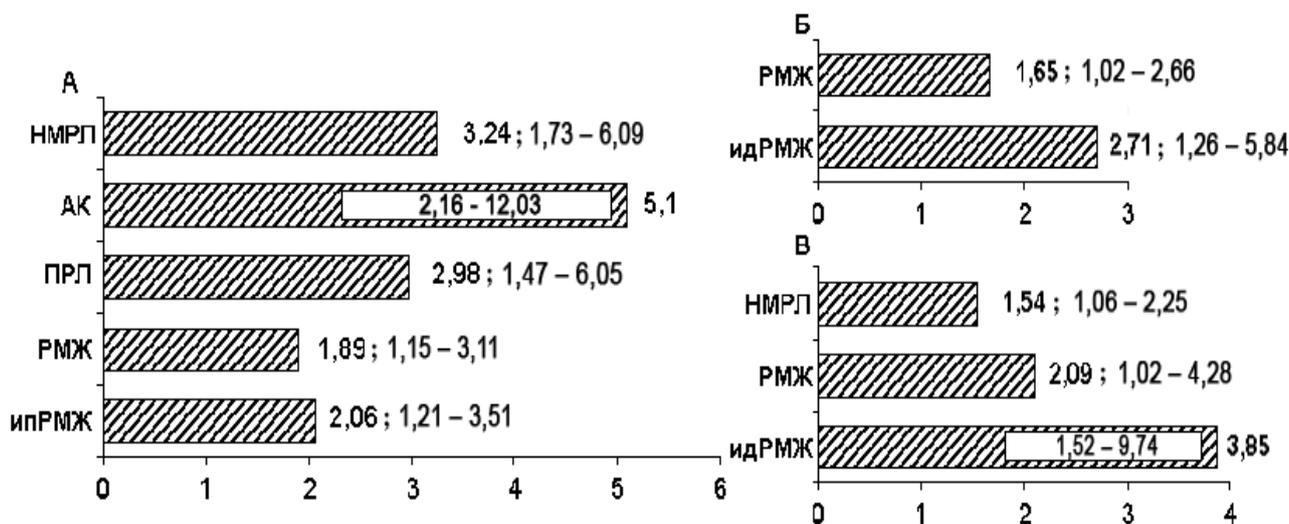


Рисунок 1. Показатели отношения шансов (OR) развития злокачественных новообразований для носителей нулевых генотипов генов *GSTT1* (А), *GSTM1* (Б) и *Val/Val* генотипа гена *GSTP1* (В) при $p < 0,05$ и доверительном интервале – 95% (CI95%).

В настоящем исследовании не было установлено значимого увеличения риска развития НМРЛ в случае делеционного полиморфного маркера гена *GSTM1*. Однако нами установлена ассоциация «нулевого» генотипа гена *GSTM1* с повышенным риском развития рака молочной железы, что ранее было отмечено для итальянской популяции (*Ramalhinho et al., 2012*). Для больных РМЖ инфильтративно-долькового типа (идРМЖ) также было зарегистрировано статистически значимое увеличение частоты генотипа (–/–) гена *GSTM1* по сравнению с контрольными значениями ($\chi^2 = 6,80$) (рис. 1Б).

Частоты генотипов *Ile/Val* и *Val/Val* полиморфного маркера *Ile105Val* гена *GSTP1* среди больных с НМРЛ были статистически значимо выше, чем в контрольной группе (рис. 1В). Для аденокарциномы легкого в группе больных также была установлена статистически более высокая частота предрасполагающего генотипа по сравнению со здоровыми лицами (20,5% при $p = 0,04$). Результаты, полученные нами, для русской популяции московского региона показаны впервые. Для РМЖ и идРМЖ была установлена высокодостоверная ассоциация генотипа *Val/Val* полиморфного маркера *Ile105Val* гена *GSTP1* с риском возникновения этих опухолей (рис. 1В). Показано значимое увеличение частоты генотипа *Val/Val* гена *GSTP1* в группе больных с РМЖ и идРМЖ в 1,9 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контрольной группой ($\chi^2 = 7,48$, $p = 0,02$ и $\chi^2 = 9,26$, $p = 0,01$, соответственно).

Следует отметить, что ранее ассоциация этого полиморфного маркера с риском развития РМЖ была установлена только для представителей монголоидной расы (*Lu et al., 2011; Feng et al., 2012*).

Также нами был проведен анализ распределения частот генотипов полиморфных маркеров генов глутатион-S-трансфераз *T1*, *M1* и *P1* у больных НМРЛ и РМЖ в зависимости от клинико-патогенетических характеристик злокачественного процесса (табл. 2 и 3).

подавляющее большинство случаев НМРЛ обусловлено курением. Курение само по себе является фактором риска развития возникновением опухоли (*Zhang and Liu, 2013*), а при наличии у пациентов «нулевых» генотипов генов *GSTT1* или *GSTM1* показано увеличение риска развития немелкоклеточного рака легкого в несколько раз (*Cabral et al., 2010*). Полученные нами данные подтверждают данный факт (табл. 2).

Таблица 2.

Ассоциация нулевого генотипа гена *GSTT1* с риском развития НМРЛ у больных, объединённых в группы по клинико-патогенетическим параметрам.

Отягощённость курением							
Ген	Генотип	НМРЛ n = 46	Контроль n = 42	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,543	0,857	10,16	0,006	0,20	0,07 – 0,56
	(-/)	0,457	0,143			5,04	1,78 – 14,27
Возраст (более 60 лет)							
Ген	Генотип	НМРЛ n = 41	Контроль n = 66	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,512	0,864	15,81	0,0004	0,17	0,07-0,42
	(-/)	0,488	0,136			6,03	2,37-15,32
Стадия I/II							
Ген	генотип	НМРЛ n = 48	Контроль n = 160	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,708	0,863	6,13	0,01	0,39	0,18-0,83
	(-/)	0,292	0,138			2,58	1,20-5,57
Стадия III/IV							
Ген	генотип	НМРЛ n = 40	Контроль n = 160	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,525	0,863	22,37	1x10 ⁻⁵	0,18	0,08-0,38
	(-/)	0,475	0,138			5,68	2,64-12,21

У исследованной нами группы курящих больных обнаружено, что частота генотипа (-/-) гена *GSTT1* оказалась более чем в 3 раза выше, чем у некурящих пациентов, а относительный риск развития НМРЛ составил 5,04.

В нашем исследовании показано, что относительный риск развития НМРЛ у лиц старше 60 лет повышается в 6 раз. Среди больных со стадией III/IV частота генотипа (-/-) гена *GSTT1* была в 1,6 раза выше, чем среди больных со стадией I/II и в 3,4 раза выше, чем у здоровых индивидов – 47,5%, 29,2% и 13,8%, соответственно. Следует отметить, что риск развития РМЖ у пациенток моложе 53 лет, носителей нулевого генотипа гена *GSTT1* и генотипа *Val/Val* полиморфного маркера *Ile105Val* гена *GSTP1* составил соответственно 2,33 и 2,3 (табл. 3), что согласуется с результатами, полученными в других популяционных исследованиях (*Park et al., 2004; Kadouri et al., 2008*). В то же время нами впервые показана ассоциация нулевых генотипов генов *GSTT1* и *GSTM1* у больных со стадиями I и II рака молочной железы.

Таблица 3.

Ассоциация генотипов полиморфных маркеров генов *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* с риском развития рака молочной железы у различных групп больных.

Возраст до 53 лет							
Ген	Генотип	РМЖ n = 76	Контроль n = 80	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,579	0,763	11,93	0,0006	0,43	0,26 – 0,70
	(-/-)	0,421	0,238			2,33	1,44 – 3,80
<i>GSTP1</i>	<i>Ile/Ile</i>	0,329	0,588	10,81	0,005	0,34	0,18 – 0,66
	<i>Ile/Val</i>	0,513	0,338			2,07	1,08 – 3,95
	<i>Val/Val</i>	0,158	0,075			2,31	0,82 – 6,51
Стадия I/II							
Ген	Генотип	РМЖ n = 120	Контроль n = 138	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>GSTT1</i>	(+/+)	0,592	0,710	3,99	0,05	0,59	0,35 – 0,99
	(-/-)	0,408	0,290			1,69	1,01 – 2,84
<i>GSTM1</i>	(+/+)	0,500	0,710	11,94	0,0006	0,41	0,24 – 0,68
	(-/-)	0,500	0,290			2,45	1,47 – 4,09

Мы не нашли значимой ассоциации полиморфных маркеров генов *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* с такими клиническими проявлениями прогрессии заболевания, как лимфогенное и гематогенное метастазирование, размером и степенью дифференцировки опухоли как у больных НМРЛ, так и РМЖ.

2.2. Ассоциация полиморфных маркеров генов *TP53* и *MDM2* с риском развития НМРЛ и РМЖ. Связь с клинико-гистологическими параметрами опухоли.

Ген *TP53* – является одним из ключевых генов-супрессоров опухолевого роста. Недостаточность этого белка ведет к неизбежному развитию злокачественных новообразований, в том числе немелкоклеточного рака легкого и рака молочной железы (*Moura Gallo et al., 2005*). На данный момент в гене *TP53* выявлено 86 полиморфных маркеров, из них 17 в экзонах и 69 в интронах (*Petitjean et al., 2007*), однако наиболее значимым является однонуклеотидный полиморфный маркер, в котором гуанин в кодоне 72 экзона 4 заменяется на цитозин (*Arg72Pro*) (*Желтухин и Чумаков, 2010*). Следует отметить, что основным функциональным регулятором активности гена *TP53*, является белок Mdm2, кодируемый одноименным геном (*MDM2*) (*Желтухин и Чумаков, 2010*).

Распределение частот генотипов полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у пациентов с НМРЛ, РМЖ и в контрольных группах представлено в табл. 1. Частота предрасполагающего генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в группе больных с НМРЛ была в 4,1 раза выше по сравнению с группой контроля ($\chi^2 = 23,64$), относительный риск развития НМРЛ при этом составил 5,46 ($CI_{95\%} = 2,60 - 11,47$, $p = 8 \times 10^{-6}$). Для генотипа *TG* полиморфного маркера *T309G* гена *MDM2* относительный риск развития НМРЛ составил 5,57 ($CI_{95\%} = 1,72 - 18,07$, $p = 0,007$) (*Wilkening et al., 2007*). Установлено, что частота предрасполагающего генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в группе больных с РМЖ в 1,5 раза выше по сравнению с группой контроля, в то же время частота генотипа *Arg/Arg* снижена в 3 раза ($\chi^2 = 23,95$), относительный риск развития РМЖ составил 1,87 ($CI_{95\%} = 1,14 - 3,06$, $p = 6 \times 10^{-6}$). Показано, что частота генотипа *TG* гена *MDM2* в группе больных с РМЖ не отличалась от таковой в контрольной группе.

При формировании групп больных по гистологическому признаку были получены

интересные данные. Так для генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* была показана значимая ассоциация с риском развития АК и ПРЛ, относительный риск развития которых составил 8,71 и 4,2, соответственно. Также было показано статистически значимое увеличение частоты предрасполагающего генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в идРМЖ и ипРМЖ в 1,6 и 1,4 раза по сравнению с контрольной группой, при этом частота защитного генотипа *Arg/Arg* была снижена в 4,5 и 3 раза соответственно. Относительный риск развития составил 2,16 для идРМЖ ($CI_{95\%} = 1,01 - 4,60$, $p = 0,003$) и 1,79 для ипРМЖ ($CI_{95\%} = 1,06 - 3,03$, $p = 4 \times 10^{-5}$). В нашем исследовании также показана статистически значимая ассоциация генотипа *TG* гена *MDM2* с повышенным риском развития АК и ПРЛ ($OR = 8,13$, $p = 0,0006$ и $OR = 7,02$, $p = 0,0004$, соответственно). Полученные нами данные находятся в согласии с данными других авторов (*Bisof et al., 2010; Proestling et al., 2012; Tilak et al., 2013*).

Нами также были изучены частоты распределения генотипов полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у больных с НМРЛ и РМЖ с различными клиничко-патогенетическими характеристиками опухоли. Так, нами установлено, что частота генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в группе больных пожилого возраста (старше 60 лет) с НМРЛ составила 36,6%, статистически значимо превышая этот показатель в контроле – 7,5% (табл. 4).

Частота генотипа *TG* гена *MDM2* в этой же группе больных была в 4,9 раз выше, чем в группе контроля. Относительный риск развития НМРЛ для исследованных генотипов составил 7,12 и 5,42, соответственно. Все это указывает на важную роль этих генотипов в развитии злокачественных новообразований (*Wilkening et al., 2007; Cáceres et al., 2009*). В то же время, при изучении влияния возрастного фактора у больных РМЖ нами были показаны значимые различия в распределения частоты генотипа полиморфного маркера *Arg72Pro* гена *TP53* у пациенток моложе 53 лет (табл. 5).

Так, частота генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* в группе больных РМЖ младшего и среднего возраста (моложе 53 лет) составила 46,1%, статистически значимо превышая этот показатель в контроле (28,8%), что указывает на ассоциацию данного генотипа с повышенным риском возникновения РМЖ. Частота генотипа *TG* гена *MDM2* в той же возрастной группе больных не превышала таковую в группе контроля. Полученные нами результаты согласуются с данными зарубежных авторов (*Lång et al., 2009*).

Таблица 4.

Распределение частот генотипов полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* среди больных НМРЛ.

Возраст (старше 60 лет)							
Ген	Генотип	НМРЛ n = 41	Контроль n = 160	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>TP53</i>	<i>Arg/Arg</i>	0,244	0,406	23,95	6×10^{-6}	0,47	0,22 – 1,03
	<i>Arg/Pro</i>	0,390	0,519			0,59	0,29 – 1,20
	<i>Pro/Pro</i>	0,366	0,075			7,12	2,99 – 16,92
<i>MDM2</i>	<i>T/T</i>	0,878	0,975	7,17	0,03	0,18	0,05 – 0,72
	<i>T/G</i>	0,122	0,025			5,42	1,38 – 21,19
Отягощённость курением							
Ген	Генотип	НМРЛ n = 46	Контроль n = 160	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>TP53</i>	<i>Arg/Arg</i>	0,370	0,406	14,98	0,0006	0,86	0,44 – 1,69
	<i>Arg/Pro</i>	0,348	0,519			0,49	0,25 – 0,98
	<i>Pro/Pro</i>	0,283	0,075			4,86	2,03 – 11,60
<i>MDM2</i>	<i>T/T</i>	0,870	0,975	8,60	0,01	0,17	0,05 – 0,63
	<i>T/G</i>	0,130	0,025			5,85	1,58 – 21,72
Стадия I/II							
Ген	Генотип	НМРЛ n = 54	Контроль n = 160	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>TP53</i>	<i>Arg/Arg</i>	0,204	0,406	21,91	2×10^{-5}	0,37	0,18 – 0,78
	<i>Arg/Pro</i>	0,481	0,519			0,86	0,46 – 1,60
	<i>Pro/Pro</i>	0,315	0,075			5,67	2,49 – 12,89
<i>MDM2</i>	<i>T/T</i>	0,849	0,975	11,88	0,003	0,14	0,08 – 3,19
	<i>T/G</i>	0,151	0,025			6,93	2,00 – 24,08
Стадия III/IV							
Ген	Генотип	НМРЛ n = 34	Контроль n = 160	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>TP53</i>	<i>Arg/Arg</i>	0,294	0,406	23,67	7×10^{-6}	0,61	0,27 – 1,36
	<i>Arg/Pro</i>	0,324	0,519			0,44	0,20 – 0,97
	<i>Pro/Pro</i>	0,382	0,075			7,63	3,08 – 18,93

Таблица 5.

Распределение частот генотипов полиморфного маркера *Arg72Pro* гена *TP53* среди больных РМЖ в возрасте до 53 лет.

Возраст до 53 лет							
Ген	Генотип	РМЖ n = 76	Контроль n = 80	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>TP53</i>	<i>Arg/Arg</i>	0,092	0,463	26,48	2×10^{-6}	0,12	0,05 – 0,29
	<i>Arg/Pro</i>	0,447	0,250			2,43	1,23 – 4,79
	<i>Pro/Pro</i>	0,461	0,288			2,12	1,09 – 4,10

При сравнении частот генотипов полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* у больных НМРЛ, отягощённых курением, была показана ассоциация генотипа *Pro/Pro* гена *TP53* и генотипа *TG* гена *MDM2* с риском развития НМРЛ для курящих пациентов (OR = 4,86, $p = 0,0006$ и OR = 5,85, $p = 0,01$) (табл. 4), что согласуется и с данными других авторов (*Wilkening et al., 2007; Cáceres et al., 2009; Hancox et al., 2009*).

Мы не обнаружили значимой ассоциации полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53* и *T309G* гена *MDM2* с такими клиническими проявлениями прогрессии заболевания, как лимфогенное и гематогенное метастазирование, размером и степенью дифференцировки опухоли как у больных НМРЛ, так и РМЖ, а также стадией опухоли у больных с РМЖ.

2.3. Сравнительный анализ исследованных генов и их комбинаций у больных с немелкоклеточным раком легкого и раком молочной железы.

Значительный интерес представляет изучение ассоциации сочетанных генотипов полиморфных маркеров. Следует отметить, что в зарубежной практике исследования ассоциации сочетанных генотипов с развитием заболевания и его прогрессией наблюдается не так часто (*Sreeja et al., 2008*). Для пациентов московского региона подобный анализ проводился впервые.

Мы показали, что “нулевой” сочетанный генотип (–/–) генов *GSTM1* и *GSTT1* в 2,6 раза чаще встречается у больных НМРЛ – 27,3 против 10,6% в группе контроля ($\chi^2 = 11,4$) (Рис. 4А). Относительный риск развития НМРЛ для данного сочетания генотипов составил 3,15 (CI_{95%} = 1,59 – 6,27, $p = 0,003$). Также была обнаружена высокодостоверная ассоциация сочетанного генотипа (–/–)/(Val/Val) генов *GSTT1* и *GSTP1*. Мы выявили, что частота такого сочетанного генотипа в 3 раза выше у больных НМРЛ – 11,4 против 3,8% в группе контроля ($\chi^2 = 5,45$) (Рис. 4Б). При этом относительный риск развития составил 3,29 (CI_{95%} = 1,15-9,39, $p = 0,02$), что согласуется с данными других авторов (*Sreeja et al., 2008*). Проведенный нами анализ показал, что в группах больных РМЖ сочетанный генотип *GSTM1(–/–)/GSTT1(–/–)* встречается в 2,2 раза чаще, чем в контрольной группе (45,7% против 21%; $\chi^2 = 19,05$) (Рис. 4А). Относительный риск развития РМЖ при носительстве данного сочетанного генотипа составляет 3,17 (CI_{95%} = 1,87-5,36, $p = 7,0 \times 10^{-5}$).

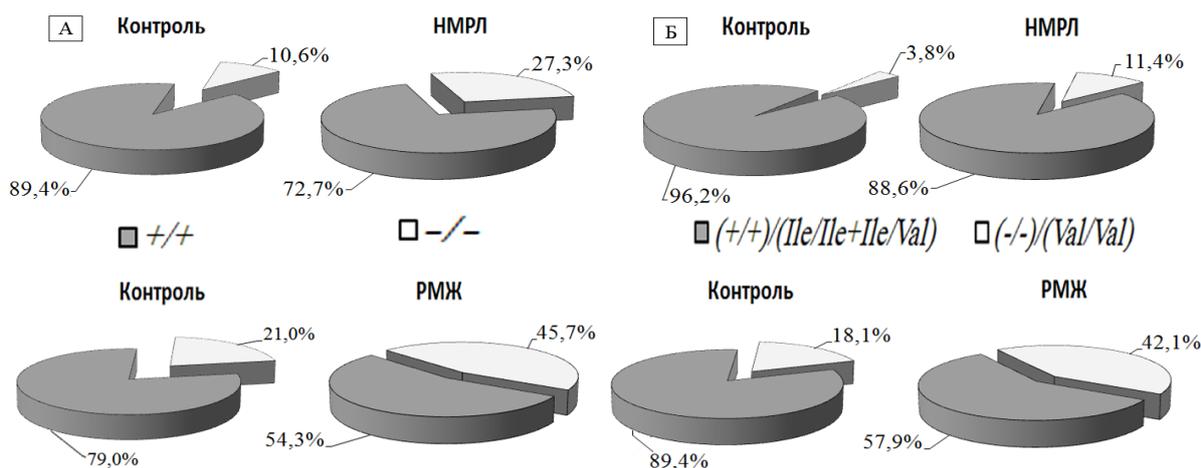


Рисунок 4. Распределение частот сочетанных генотипов генов *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* в контрольной группе и группе больных с НМРЛ и РМЖ: **А.** «нулевых» генотипов генов *GSTM1* и *GSTT1*; **Б.** генотипа $(-/-)/(Val/Val)$ генов *GSTT1* и *GSTP1*.

Сочетанный генотип $GSTT1(-/-)/GSTM1(-/-)/GSTP1(Val/Val)$ встречается у больных РМЖ в 2,3 раза чаще, чем в контрольной группе: 42,1% против 18,1% ($\chi^2 = 19,03$). При этом относительный риск развития составляет 3,29 ($CI_{95\%}=1,90-5,69$, $p=8,0 \times 10^{-5}$) (Рис. 4Б). Сходные данные получены в исследованиях в других популяциях (Saxena et al., 2009; Ramalhinho et al., 2011).

Также интерес представляют результаты, полученные при изучении распределения частот сочетанных генотипов изученных полиморфных маркеров генов *TP53* и *MDM2*. Так, частота сочетанного генотипа $(Pro/Pro)/(TG)$ генов *TP53* и *MDM2* в группе больных НМРЛ составила 9,1% ($\chi^2 = 9,02$, $p = 0,01$, $OR = 7,90$, $CI_{95\%} = 1,64 - 38,07$), статистически значимо превышая этот показатель в контроле 1,3 %. Следует также отметить увеличение частоты сочетанного генотипа $(Arg/Pro+Pro/Pro)/(TG)$ генов *TP53* и *MDM2* и в группе больных с АК и в группе больных с ПРЛ в 7-8 раз по сравнению с контрольной группой ($\chi^2 = 7,88$ и $\chi^2 = 8,82$, соответственно) (Рис. 5А). При этом относительный риск развития АК составил 9,12 ($CI_{95\%} = 1,45 - 57,21$, $p = 0,02$), а ПРЛ – 8,59 ($CI_{95\%} = 1,61 - 45,73$, $p = 0,01$). Наши результаты согласуются с данными зарубежных авторов (Wilkening et al., 2007). Следует отметить, что частота сочетанного генотипа $Pro/Pro + TG$ генов *TP53* и *MDM2* в группе больных РМЖ составила 33,3%, что статистически значимо превышает этот показатель в контрольной группе (2,7%) ($p = 0,0016$).

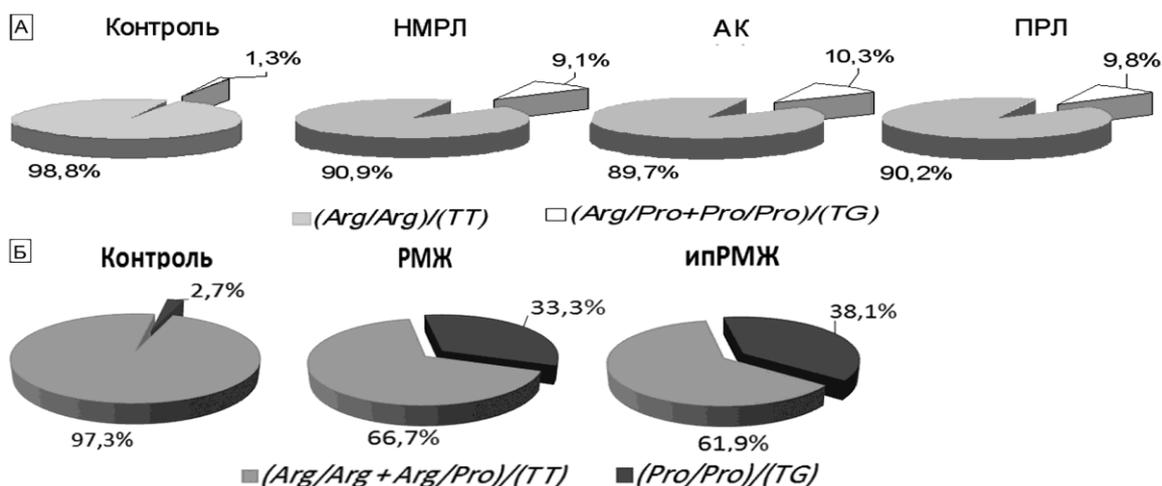


Рисунок 5 Распределение частот сочетанных генотипов генов *TP53* и *MDM2*: **А.** в контрольной группе и группе больных с НМРЛ и его гистотипами (АК, ПРЛ); **Б.** в контрольной группе и группе больных РМЖ и его основного гистотипа (ипРМЖ).

Таблица 6.

Распределение частот сочетанных генотипов гена *TP53* и генов II фазы биотрансформации ксенобиотиков с развитием НМРЛ и РМЖ.

Ген	Генотип	НМРЛ n=36	Контроль n=43	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
+ GSTT1	<i>I + Arg/Arg</i>	0,417	0,767	10,11	0,006	0,22	0,08 – 0,57
	<i>D + Arg/Pro + Pro/Pro</i>	0,583	0,233			4,62	1,75 – 12,18
+ GSTP1		НМРЛ n=55	Контроль n=47	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
	<i>Ile/Ile + Arg/Arg</i>	0,127	0,468			14,47	0,0007
	<i>Ile/Val + Val/Val + Arg/Pro + Pro/Pro</i>	0,873	0,532			6,03	2,27 – 16,05
+ GSTT1 + GSTM1		НМРЛ n=37	Контроль n=39	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
	<i>I + Arg/Arg</i>	0,405	0,718			7,55	0,02
	<i>D + Arg/Pro + Pro/Pro</i>	0,595	0,282			3,73	1,43 – 9,73
+ GSTT1 + GSTM1 + GSTP1		НМРЛ n=33	Контроль n=33	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
	<i>I + Ile/Ile + Arg/Arg</i>	0,333	0,667			7,33	0,03
	<i>D + Ile/Val + Val/Val + Arg/Pro + Pro/Pro</i>	0,667	0,333			4,00	1,44 – 11,13
+ GSTM1		РМЖ n=56	Контроль n=45	χ^2	P	OR	
						знач.	CI _{95%}
	<i>I + Arg/Arg</i>	0,071	0,267			7,13	0,03
	<i>D + Arg/Pro + Pro/Pro</i>	0,929	0,733			4,73	1,41 – 15,90

При рассмотрении сочетания генотипов изученных полиморфных маркеров генов *TP53* и *MDM2* в гистологических подтипах РМЖ, было отмечено увеличение частоты встречаемости генотипа *Pro/Pro + TG* в группе больных ипРМЖ в 14 раз ($p = 0,0007$) (Рис. 5Б).

Нами также была изучена ассоциация сочетанных генотипов полиморфного маркера *Arg72Pro* гена *TP53* и генов фазы II биотрансформации ксенобиотиков с риском развития НМРЛ и РМЖ (табл. 6). Важно отметить, что с относительным риском развития РМЖ ассоциирован только сочетанный генотип генов *TP53* и *GSTM1* ($OR = 4,73$, $p = 0,03$). Таким образом, комбинация неблагоприятных вариантов данных генов может обсуждаться как значимый фактор увеличения онкологического риска для НМРЛ и РМЖ.

2.4. Анализ метилирования промоторных районов генов *MGMT* и *RASSF1A* при НМРЛ и РМЖ, связь с прогрессией рака.

В данном разделе представлены результаты исследования спектра метилирования промоторных районов генов-супрессоров *MGMT* и *RASSF1A* в опухолях немелкоклеточного рака лёгкого (49 случаев) и рака молочной железы (58 случаев). В работе использован метод метил-специфичной ПЦР (МС-ПЦР)

Для всех исследованных генов обнаружены более частые случаи метилирования в образцах опухолевой ткани, чем в образцах условно нормальной ткани легкого и молочной железы, причем различия статистически значимые ($P \leq 0,05$ по Фишеру, табл. 7). Кроме того, анализ образцов ДНК тканей легкого и молочной железы десяти доноров показал полное отсутствие метилирования этих генов (табл. 7).

Частота метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* в образцах НМРЛ и РМЖ составляет от 19% до 31%. Следует отметить, что метилирование промоторного района гена *RASSF1A* наблюдали и в образцах ДНК из гистологически нормальной ткани (2%, 1/49), прилежащей к опухоли. Также нами показано значимое различие по частоте метилирования гена *RASSF1A* у пациентов с плоскоклеточным раком легкого и инфильтративно-дольковым раком молочной железы ($p = 0,0024$ и $p = 0,035$, соответственно) и условно нормальной, прилежащей тканью. Ген *MGMT* значимо чаще метилирован у пациентов с АК, ПРЛ и ипРМЖ ($p = 0,02$, $p = 0,012$ и $p = 0,015$, соответственно), чем в условно нормальной, прилежащей ткани.

Таблица 7.

Частота метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* в образцах ДНК пациентов с НМРЛ и РМЖ и их гистологическими типами. Использовали ДНК опухоли (О) и прилежащей гистологически нормальной ткани (Н).

Вид рака и его гистологические типы	<i>RASSF1A</i>			<i>MGMT</i>			Доноры
	О	Н	<i>P</i> *	О	Н	<i>P</i> *	
Немелкоклеточный рак легкого	15/49, 31%	1/49, 2%	0,0002	15/49, 31%	0/49, 0%	0,0001	0/10, 0%
Аденокарцинома	4/20, 20%	0/20, 0%	<i>P</i> > 0,05	7/20, 35%	0/20, 0%	0,02	0/10, 0%
Плоскоклеточный рак легкого	11/29, 38%	1/29, 3%	0,0024	8/29, 28%	0/29, 0%	0,012	0/10, 0%
Рак молочной железы	11/58, 19%	0/58, 0%	0,002	12/58, 21%	0/58, 0%	0,00097	0/10, 0%
Инфильтративно-протоковый	5/44, 11%	0/44, 0%	<i>P</i> > 0,05	8/44, 18%	0/44, 0%	0,015	0/10, 0%
Инфильтративно-дольковый	6/14, 43%	0/14, 0%	0,035	4/14, 29%	0/14, 0%	<i>P</i> > 0,05	0/10, 0%

* *p* – достоверность различия частоты метилирования исследованных генов в ДНК опухоли и условно нормальной ткани того же пациента; рассчитана по Фишеру.

Данные о метилировании промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT* противоречивы и изменяются в широких пределах: от 36 до 65% для гена *RASSF1A* и от 30 до 64% для гена *MGMT* при НМРЛ, а также от 19 до 87% для гена *RASSF1A* и от 0-8 до 25% для гена *MGMT* при РМЖ (Esteller et al., 2001; Землякова и др., 2003; Sharma et al., 2010; Ekim et al., 2011; Jiang et al., 2012; Tserga et al., 2012). При этом определенные нами частоты метилирования гена *RASSF1A* при РМЖ и НМРЛ весьма близки или совпадают с литературными данными (Pfeifer et al., 2002). Также с данными литературы согласуются данные о частоте метилирования промоторного района гена *MGMT* в НМРЛ (Zochbauer-Muller et al., 2002). Однако нами впервые отмечено значительное повышение частоты метилирования гена *MGMT* при РМЖ до 31%.

Частота метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* у больных с аденокарциномой, составила 20% и 35% соответственно, что в 2 раза ниже и выше значений приведенных в литературе для этих генов (40,5 и 17%, соответственно) при НМРЛ (Choi et al., 2005; Kim et al., 2005). Для больных с плоскоклеточным раком лёгкого частота метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* составила 38% и 28%

соответственно, что в 2 - 2,8 раз выше частоты метилирования этих генов приведенной в литературе (*Hawes et al., 2010*). Частота метилирования гена *RASSF1A* при идРМЖ составила 43%, что согласуется с данными, полученными ранее (*Логинов и др., 2004*). Данные по частоте метилирования гена *MGMT* в идРМЖ получены нами впервые. Для больных с инфильтративно-проточным РМЖ значения частоты метилирования для этих генов составили 11% и 18%, соответственно, что в 8 раз ниже для гена *RASSF1A* и в 2 раза выше для гена *MGMT* по сравнению с данными мировых исследований (85% и 9%, соответственно) (*Muggerud et al., 2010*).

Наблюдаемые различия в частотах метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* могут быть связаны как с чувствительностью использованного метода, так и с этнографическими особенностями западноевропейской, американской и российской (московской) популяций.

Нами также были исследованы возможные корреляции между частотами метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* и размером опухоли, клинической стадией, степенью дифференцировки и метастазированием при НМРЛ и РМЖ. Статистически значимая корреляция частоты метилирования гена *MGMT* с размером опухоли выявлена при НМРЛ и РМЖ ($p \leq 0,05$, по Фишеру) (рис. 8А, Б), для гена *RASSF1A* – при РМЖ ($p = 0,035$, рис. 8Б). Данная зависимость сохраняется и при сравнении гистологических подтипов НМРЛ (аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого, рис. 8В) и РМЖ (ипРМЖ, рис.8Г). С переходом от ранних (I + II) к более поздним (III + IV) клиническим стадиям статистически значимо увеличивается частота метилирования гена *MGMT* при НМРЛ (7% против 65%, $p \leq 0,05$, рис. 8А) и РМЖ (8% против 100%, $p \leq 0,05$, рис. 8Б), а гена *RASSF1A* только при РМЖ (14% против 50%, $p \leq 0,05$, рис. 8Б).

Частота метилирования гена *MGMT* также статистически значимо ($p \leq 0,05$) увеличивается на более поздних стадиях онкологического процесса при АК, ПРЛ и ипРМЖ (рис. 8В, Г), а гена *RASSF1A* при ипРМЖ (рис. 10Г). Для гена *MGMT* показана также значимая корреляция частоты метилирования с потерей дифференцировки при РМЖ (6%, в высоко и средне дифференцированных опухолях против 43%, в низко дифференцированных опухолях, ($p = 0,0008$, рис. 8Б), ПРЛ ($p = 0,038$, рис. 8В) и ипРМЖ ($p = 0,019$, рис. 8Г). Для гена *RASSF1A* такая связь отмечена только при РМЖ и ипРМЖ (рис. 8Б, Г).

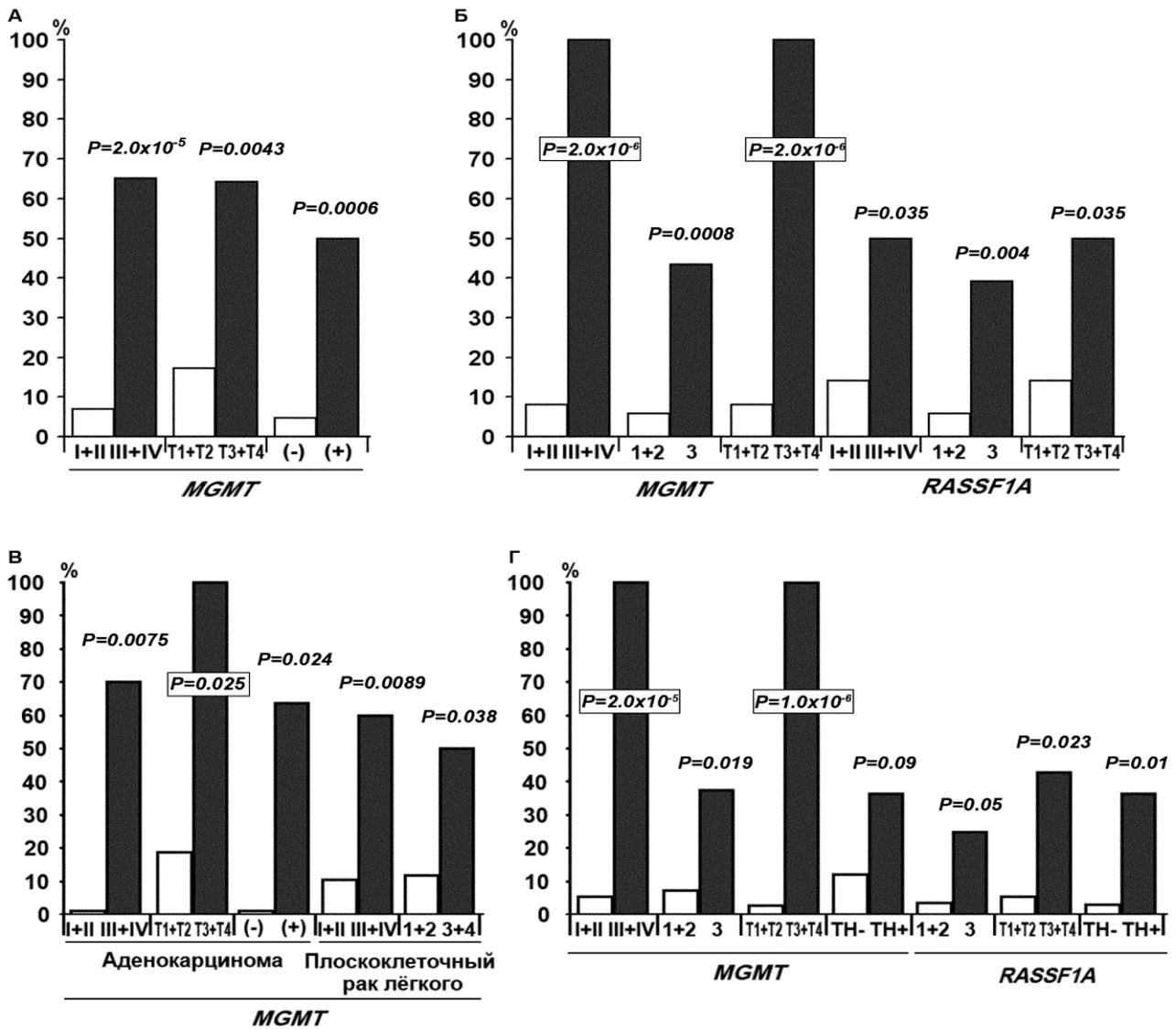


Рисунок 8. Корреляция частоты метилирования генов *MGMT* и *RASSF1A* с параметрами прогрессии НМРЛ и РМЖ: **А.** Корреляция частоты метилирования гена *MGMT* со стадией, размером опухоли и наличием/отсутствием метастазов для НМРЛ. **Б.** Корреляция частоты метилирования генов *MGMT* и *RASSF1A* со стадией, степенью анаплазии и размером опухоли для РМЖ. **В.** Корреляция частоты метилирования гена *MGMT* со стадией, размером опухоли и наличием/отсутствием метастазов для АК и ПРЛ. **Г.** Корреляция частоты метилирования генов *MGMT* и *RASSF1A* со стадией, степенью анаплазии, размером опухоли и тройным негативным фенотипом для ипРМЖ. Достоверность рассчитана с помощью теста Фишера.

Для НМРЛ и аденокарциномы легкого было показано, что частота метилирования гена *MGMT* в образцах ДНК выделенной у пациентов с метастазированием в лимфотические узлы и другие органы значимо выше таковой ($p \leq 0.05$, по Фишеру) у пациентов без метастазов.

При раке молочной железы нами было исследовано изменение частоты метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* в зависимости от иммуно-гистохимического

статуса опухоли. Было показано, что при тройном негативном РМЖ, характеризующимся агрессивным течением и отсутствием в большинстве случаев привычных для этого заболевания терапевтических мишеней – рецепторов эстрогенов (ER), прогестерона (PgR) и HER2/neu (Тюляндин и др, 2010), происходит увеличение частоты метилирования обоих генов (33% и 40%, соответственно). Однако статистически маргинально значимое различие показано только для инфильтративно-протокового РМЖ ($0.1 < p \leq 0.05$, по Фишеру, рис. 10Г). Полученные нами данные согласуются с данными других исследований (Feng et al., 2007; Xu et al., 2012).

Значительный интерес представляет также данные полученные при изучении сочетанного влияния метилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT* и предрасполагающих генотипов полиморфных маркеров генов *TP53*, *GSTT1* и *GSTM1*.

Нами не выявлено ни одной ассоциации сочетанных генотипов исследованных генов с риском развития НМРЛ, что может говорить о независимом влиянии метилирования промоторных районов генов (*RASSF1A* и *MGMT*) и полиморфных маркеров генов трансформации ксенобиотиков и апатоза (*GSTT1*, *GSTM1* и *TP53*) на риск развития немелкоклеточного рака легкого.

При анализе различных сочетаний генотипов исследованных маркеров у пациентов с РМЖ было показано, что частота сочетанного генотипа *Pro/Pro* (*TP53*) + *M* (*MGMT*) в группе больных с РМЖ составила 60% ($p = 0,03$), статистически значимо превышая этот показатель в контрольной группе (23,3%) ($\chi^2 = 6,82$, OR = 4,95, CI_{95%}=1,42 – 17,31). Также, было показано что частота сочетанного генотипа *M*(*RASSF1A* и *MGMT*) + (*Arg/Pro* и *Pro/Pro*)(*TP53*) + *D/D*(*GSTT1* и *GSTM1*) в группе больных с РМЖ в 4,8 раза выше таковой в контрольной группе ($\chi^2 = 6,5$), относительный риск составил 6,67 (CI_{95%}=1,36 – 32,70, $p = 0,04$). Все это говорит о значительном вкладе метилирования в развитие рака молочной железы.

Таким образом, нами впервые установлена достоверная корреляция частоты метилирования промоторного района гена *MGMT* с клинико-гистологическими параметрами РМЖ. Впервые исследована связь метилирования генов *RASSF1A* и *MGMT* и гормонального статуса рецепторов при РМЖ у пациентов московского региона. Также впервые получены данные о совместном влиянии метилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT* и предрасполагающих генотипов полиморфных маркеров генов *TP53*, *GSTT1* и *GSTM1* на риск развития РМЖ.

Все это позволяет рассматривать данные гены как молекулярные маркеры неблагоприятного прогноза в особенности для больных с РМЖ. (Karray-Chouayekh et al., 2010; Wang et al., 2011; Xu et al., 2012).

ВЫВОДЫ

1. Обнаружена высокодостоверная ассоциация полиморфных маркеров генов систем биотрансформации (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) и пролиферации клеточного цикла и апоптоза (*TP53* и *MDM2*) с развитием немелкоклеточного рака лёгкого и рака молочной железы и их гистологических подтипов.
2. Составлен профиль метилирования CpG-островков промоторных районов генов *MGMT* и *RASSF1A*. Впервые показано значимое повышение частоты метилирования гена *MGMT* при раке молочной железы.
3. Показана ассоциация полиморфных маркеров изученных генов (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *TP53* и *MDM2*) и метилирования промоторных районов генов *MGMT* и *RASSF1A* с клинико-гистологическими и патофизиологическими параметрами опухолей.
4. Впервые выявлена статистически значимая ассоциация частоты метилирования гена *MGMT* с прогрессией рака молочной железы, в том числе и у пациентов с трижды негативным раком молочной железы.
5. Обнаружены высокодостоверные ассоциации сочетанных генотипов исследованных в работе генов с риском развития немелкоклеточного рака лёгкого и рака молочной железы. Выявлены как общие, так и специфичные предрасполагающие сочетанные генотипы для немелкоклеточного рака лёгкого и рака молочной железы.
6. Показано независимое влияние на риск развития немелкоклеточного рака лёгкого генетических и эпигенетических факторов онкологического процесса.
7. Впервые показана связь полиморфных маркеров ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков и апоптоза с метилированием генов супрессоров опухолей с риском развития рака молочной железы.

Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. **А.М. Бурденный**, Т.П. Казубская, Э.А. Брага, В.В. Носиков, В.И. Логинов. Ассоциация генов TP53 и MDM2 с риском развития рака молочной железы у русских женщин Московского региона. // Медицинская генетика №2, 28-31 (2013)
2. **Бурденный А.М.**, Казубская Т.П., Брага Э.А., Носиков В.В., Логинов В.И. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с раком молочной железы у женщин Московского региона. // Молекулярная медицина №5, 30-34 (2012)
3. Аткарская М.В., Логинов В.И., Заварыкина Т.М., **А.М. Бурденный**, С.В. Рыков, Т.П. Казубская, Г.П. Жижина, Э.А. Брага. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития немелкоклеточного рака легкого у русских московского региона. // Молекулярная медицина №3, 34-37, (2012)
4. T. Zavarykina, V. Loginov, M. Atkarskaya, **A. Burdennyu**, T. Kazubskaya, E. Braga, G. Zhizhina. Genetic polymorphic markers of xenobiotic transformation and proliferation control genes associated with risk of lung cancer and cancer of upper respiratory tract. // Modern Problems in Biochemical Physics: New Horizons. Nova Science Publishers, Inc., NY.. chapter XIX, 155-162. (2012)
5. **Бурденный А.М.**, Аткарская М.В., Логинов В.И., Заварыкина Т.М., Казубская С.В., Жижина Г.П. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития немелкоклеточного рака легкого у русских московского региона. Тезисы докладов научной конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», Казань, Россия, 31-32 (2012)
6. **Бурденный А.М.**, Логинов В.И., Брага Э.А. Ассоциация полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития опухоли разной локализации у жителей московского региона. VII региональная конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» Сибирский Онкологический журнал, 312-313 (2012)

7. М.В. Аткарская, В.И. Логинов, Т.М. Заварыкина, **А.М. Бурденный**, Т.П. Казубская, Г.П. Жижина, Э.А. Брага. Ассоциация полиморфных маркеров генов TP53 и MDM2 с развитием рака легких и верхних дыхательных путей. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные проблемы онкогенетики», Москва, Россия, октябрь, 2011. Медицинская генетика Т. 10, № 10,. С. 3-4. (2011)
8. В.И. Логинов, М.В. Аткарская, Т.М. Заварыкина, **А.М. Бурденный**, Т.П. Казубская, Э.А. Брага, Г.П. Жижина. Изучение вклада генов детоксикации в развитии рака легкого. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные проблемы онкогенетики», Москва, Россия, октябрь, 2011. Медицинская генетика Т. 10, № 10,. С. 14. (2011)
9. Т.М. Заварыкина, В.И. Логинов, М.В. Аткарская, **А.М. Бурденный**, Т.П. Казубская, Э.А. Брага, Г.П. Жижина. Анализ связи полиморфных маркеров генов биотрансформации ксенобиотиков с риском развития рака легких и верхних дыхательных путей. Материалы XV Российского онкологического конгресса, Москва, Россия, ноябрь. С. 149-150. (2011)
10. Atkarskaya M.I., Loginov V., Zavarykina T., **Burdenny A.**, Kazubskaya T., Zhizhina G., Braga E. Genetic polymorphic markers of proliferation control genes associated with risk of lung cancer and cancer of upper respiratory tract. Abstracts of the 4th International Conference for Young Scientists 2011 “Molecular biology: advances and prospectives” Kyiv, Ukraine, September, p. 138. P-MG2.46 (2011)
11. Zavarykina T., Loginov V., Atkarskaya M., **Burdenny A.**, Kazubskaya T., Braga E., Zhizhina G. Genetic polymorphic markers of genes of xenobiotic biotransformation enzymes associated with risk of lung cancer and cancer of upper respiratory tract. Abstracts of the 4th International Conference for Young Scientists 2011 “Molecular biology: advances and prospectives” Kyiv, Ukraine, September, p. 145. P-MG2.53 (2011)