

В.В. Ляхович, В.А. Вавилин, А.Ю. Гришанова, Л.Ф. Гуляева, С.П. Коваленко

ГЕНОМНАЯ МЕДИЦИНА И НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ*

ГУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск

Авторы рассматривают современные направления геномных исследований в онкологии с привлечением собственных результатов. Представлены результаты исследований связи полиморфизма генов метаболизма ксенобиотиков (*CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *NAT2*) с предрасположенностью к раку легкого, изучения экспрессии генов апоптоза и ангиогенеза (*IL-8*, *Bcl-2*, *VEGF*) при раке матки, шейки матки и щитовидной железы, а также связи полиморфизма генов множественной лекарственной резистентности (*MDR1*, *GSTP1*) и активности Р-гликопротеина с эффективностью химиотерапии у больных с хроническими лимфопролиферативными заболеваниями. Публикуется способ оценки дозы гена *HER2* для прогнозирования эффективности применения герцептина у больных раком молочной железы.

Ключевые слова: онкопатология, генетический полиморфизм, экспрессия генов, молекулярные маркеры предрасположенности, трансформации, лекарственной резистентности

Геномная медицина – новое направление науки на стыке молекулярной генетики, клеточной биологии и современной медицины. Геномная медицина увязывает патологические процессы человека с процессами реализации генетической информации и с индивидуальными, генетически обусловленными особенностями пациента. На сегодняшний день можно выделить несколько направлений исследований в геномной медицине:

1. Генетический полиморфизм и наследственно обусловленные индивидуальные различия в предрасположенности к различным заболеваниям; особенности ответа на воздействие лекарственных препаратов (фармакогенетика).

2. Изменения экспрессии специфических генов при различных патологиях, которая может быть как маркером заболевания, так и причиной этого заболевания.

3. Изменения экспрессии генов в результате генетической реорганизации в клетках патологических тканей (прежде всего в тканях различных опухолей); формирование прогноза развития патологий и обоснованных рекомендаций по лечению.

Онкологические заболевания являются центральной темой многих исследований в русле геномной медицины. Это вполне объяснимо, ведь первопричиной злокачественного роста являются именно генетические аномалии, приводящие к нарушению управления процессом деления клеток. Как и всякая медицинская дисциплина, онкология решает задачи профилактики, диагностики и лечения. Применительно к ним и с ориентацией на индивидуума геномная медицина изучает генетические факторы предрасположенности к онкозаболеваниям, ранние молекулярные признаки злокачественной трансформации и основные компоненты диспозиции противоопухолевых препаратов. Ниже в этой логической последовательности будут рассмотрены некоторые возможности геномных технологий в онкологии.

Ассоциация полиморфизмов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с предрасположенностью к онкозаболеваниям

Важным результатом онкологических исследований является формирование представлений о многостадийности развития опухоли [6]. Первыми в ряду событий являются процессы инициации, и в силу этого с ними в значительной мере связаны само возникновение онкозаболеваний, их риск и возможности профилактики.

По оценкам Международного агентства по изучению рака, 80–90% всех случаев рака связаны с воздействием химических факторов [18]. Канцерогенность многих соединений связана с их генотоксичностью, причем более 75% известных канцерогенов приобретают её в результате ферментативной активации. Это объективно делает важной в инициации канцерогенеза роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК). Гены ФБК высокополиморфны; многие полиморфизмы имеют выраженные функциональные проявления, частоты некоторых достигают в популяциях европеоидов 50%, поэтому потенциально могут иметь большое эпидемиологическое значение.

В качестве факторов генетической предрасположенности к онкозаболеваниям интенсивно исследуется полиморфизм практически всех генов тех семейств, которые в суперсемействе цитохрома P450 (CYP) ответственны за метаболизм ксенобиотиков – CYP1, CYP2, CYP3, а из ферментов конъюгации более других – глутатион- и N-ацетилтрансферазы (*GST* и *NAT*). Большое число работ посвящено полиморфизму 7 экзона гена *CYP1A1* (замена 2455A>G, в результате которой происходит замена Ile462Val в гем-связывающей области фермента и увеличение активности фермента) [19].

Ряд публикаций показывают увеличение частоты аллеля *CYP1A1Val* у больных раком легкого по сравнению с группой здоровых людей [1, 4, 12, 20]. Есть такие наблюдения и для гомозиготных делеций *GSTM1* и *GSTT1*, встречающихся у европеоидов с частотой 40–60% и 20% соответственно [1, 25, 28]. В последовательности гена N-ацетилтрансферазы 2 (*NAT2*), согласно действующей номенклатуре, выявлено 13 точковых мутаций [13]. Часть из них проявляется в человеческой популяции фенотипом медленного ацетилирования, частота которого

* – часть работы поддержана грантом РФФИ № 02-04-48328.

в популяциях европеоидов составляет около 50%. Увеличение частоты медленных ацетиляторов наблюдается среди больных раком мочевого пузыря [3, 22], а быстрых ацетиляторов – среди больных колоректальным раком [9, 14].

Более чем десятилетний период исследований ассоциаций полиморфизма генов ФБК с различными онкозаболеваниями позволил [8] сделать выводы о том, что гены этой системы имеют безусловное значение, но сила связанного с ними риска значительно варьирует в подгруппах, на которые распадается популяция с учетом таких факторов, как профессия, вредные привычки, качество питания, пол, возраст и др.

В нашей работе мы исследовали ассоциацию полиморфизмов *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* и *NAT2* с раком легкого в Новосибирске. Частоты встречаемости исследованных аллелей и генотипов в контрольной группе совпадали с данными литературы по европеоидным популяциям [1, 4]. В группе больных наблюдались отклонения их частот от контрольных величин. Данные стратификационного анализа их ассоциации с подверженностью раку легкого с учетом пола, возраста и отношения к курению представлены в табл. 1. Можно видеть, что отношение шансов для Val-аллеля во всей группе равно 2,94 и его величина зависит от возраста и фактора курения. Средний возраст пациентов, имеющих аллель *CYP1A1*Val (45,9 лет), почти на 12 лет ниже, чем у пациентов, гомозиготных по Ile-аллелю (57,7 лет). Высокая частота Val-аллеля (0,117) наблюдалась также в группе некурящих больных (OR=4,85). Таким образом, полученные данные позволяют считать аллель

*CYP1A1*Val фактором предрасположенности к раку легкого.

Наблюдаемые частоты генотипов *GSTM1*”–” и *GSTT1*”–” в группе пациентов с диагнозом – рак легкого (57,4% и 25,7%) были выше, чем в контрольной группе (48,5% и 19,4%), однако для индивидуальных генотипов статистическая достоверность отношения шансов не достигается. Оценка относительного риска рака легкого для различных комбинаций генотипов *GSTM1* и *GSTT1* показала статистически достоверную связь для комбинации *GSTM1*”–”/*GSTT1*”–” в группе женщин и устойчивость к развитию заболевания для комбинации *GSTM1*”+”/*GSTT1*”–” – в группе курящих. Близок к статистической достоверности и защитный эффект комбинации двух плюс-генотипов в группе некурящих ($p < 0,1$).

Нами исследована также связь с раком легкого двух точковых мутаций гена *NAT2*, по-разному проявляющихся в фенотипе ацетилирования: замены G590A, влекущей значительное снижение скорости реакции ацетилирования, и A803G, незначительно влияющей на ее скорость [7]. Можно видеть, что последний признак ведет себя как фактор устойчивости при воздействии фактора курения. Это согласуется с данными о том, что именно медленные ацетиляторы, подвергающиеся воздействию ариламинов, имеют повышенный риск рака мочевого пузыря, что обусловлено накоплением в моче токсичных неконъюгированных N-гидроксиметаболитов, образующихся с участием цитохрома P450. У быстрых ацетиляторов происходит их инактивация и выведение из организма. Защитные эффекты быстрого фенотипа ацетилирования при воздействии табачного дыма

Таблица 1

Ассоциация валинового аллеля *CYP1A1*, нуль-генотипов *GSTM1*, *GSTT1* и их комбинаций и мутаций *NAT2* с раком легкого с учетом возраста и отношения к курению

Генотипы, аллели	Отношение шансов (95% – доверительный интервал) в подгруппах				
	все	≤50 лет	>50 лет	курящие	некурящие
<i>CYP1A1</i> -Val	2,94 (0,75–14,4)	5,78* (1,2–36,7)	1,93 (0,4–10,7)	1,49 (0,22–10)	4,85* (1,04–23,4)
<i>GSTM1</i> *0/0	1,43 (0,79–2,6)	1,57 (0,58–4,29)	1,19 (0,48–2,95)	1,05 (0,41–2,7)	1,81 (0,8–4,05)
<i>GSTT1</i> *0/0	1,44 (0,71–2,9)	1,34 (0,39–4,48)	1,82 (0,7–4,82)	1,14 (0,35–3,7)	1,96 (0,77–5,1)
<i>M1</i> *0/0/ <i>T1</i> *0/0	1,43 (0,79–0,58)	1,57 (0,58–4,29)	1,19 (0,48–2,95)	1,05 (0,41–2,65)	1,81 (0,81–4,05)
<i>M1</i> *0/0/ <i>T1</i> +	0,89 (0,49–1,6)	1,02 (0,37–2,82)	1,25 (0,25–2,8)	0,86 (0,33–2,21)	1,19 (0,53–2,65)
<i>M1</i> +/ <i>T1</i> *0/0	0,82 (0,29–2,25)	0,37 (0,01–3,12)	0,84 (0,2–4,11)	0,17* (0,02–1,17)	1,21 (0,32–4,68)
<i>M1</i> +/ <i>T1</i> +	0,74 (0,4–1,36)	0,72 (0,26–1,97)	0,9 (0,34–2,36)	1,26 (0,49–3,2)	0,47* (0,2–1,11)
<i>NAT2</i> -590A	1,16 (0,75–1,8)	1,66 (0,8–3,43)	1,04 (0,65–1,68)	1,17 (0,63–1,93)	1,15 (0,71–2,06)
<i>NAT2</i> -803G	0,76 (0,5–1,15)	0,78 (0,37–1,61)	0,75 (0,48–1,18)	0,53* (0,3–0,93)	1,04 (0,63–1,7)

Примечание. * – $p < 0,05$; p – уровень значимости различий по критерию χ^2 в сравнении с аналогичными группами в контроле.

связывают также с инактивацией аминоксифенилов [14, 22].

Баланс активации/инактивации канцерогенов складывается из соотношения активностей реакций I и II фаз биотрансформации. Поэтому мы проверили эффекты взаимодействия генотипов *CYP1A1* и *GSTM1* и *T1* на степень риска. Поскольку в нашем исследовании отчетливо наблюдался эффект возраста, данный анализ мы провели с учетом этого фактора. Анализ выявил возрастание риска заболевания для комбинации *CYP1A1Ile/Val/GSTM1* – “ в сравнении с индивидуальными генотипами (OR = 3,01; 95%CI: 0,63 – 19,1; p = 0,18 во всей группе и OR = 6,89*; 95%CI: 0,79 – 83,38; p = 0,045 у лиц не старше 50 лет). Максимальный риск наблюдался для комбинации *CYP1A1Ile/Val/GSTM1* – “/T1”+” у лиц не старше 50 лет (OR = 10,0; 95% CI: 0,2 – 704,49).

В целом, полученные результаты свидетельствуют в пользу связи полиморфизма генов ФБК с раком легкого в условиях Западно-Сибирского региона. Изученные полиморфизмы взаимодействуют между собой в детерминации риска заболевания. Сила связанного с ними риска зависит также от пола, возраста и курения.

Молекулярно-генетические маркеры опухолевой трансформации тканей

Согласно существующим представлениям, в механизмы канцерогенеза вовлечены гены регуляции клеточного роста и апоптоза – онкогены и раковые супрессорные гены [6]. Рост опухоли может быть обусловлен нарушением баланса между пролиферацией клеток и их запрограммированной гибелью, и эти молекулярные события предшествуют морфологическим изменениям и, тем более, клиническим проявлениям [5, 27]. Поэтому поиск новых молекулярных маркеров опухоли является актуальным направлением, которое определяет, в частности, возможности ранней диагностики. Одним из важных свойств злокачественной опухоли является способность ее клеток к метастазированию. Метастатический потенциал связывают со способностью стимулировать ангиогенез [5]. Известно множество молекулярных маркеров ангиогенеза, но наиболее важными из них являются цитокины – факторы роста эндотелиоцитов, в первую очередь интерлейкин 8 (*IL-8*) [10]. Одним из перспективных направлений изучения механизмов трансформации и поиска ее молекулярных маркеров является исследование экспрессии генов сигнальных молекул, ответственных за пролиферацию, апоптоз и ангиогенез.

Нами была проведена оценка экспрессии основных генов апоптоза и ангиогенеза (*Bcl-2*, *IL-8* и *VEGF*) в нормальных и опухолевых тканях матки и щитовидной железы человека.

Среди злокачественных заболеваний женских половых органов рак матки занимает второе место после рака молочной железы. Метастазы при раке матки возникают рано и распространяются, прежде всего, лимфатическим путем; позднее наблюдаются и гематогенные метастазы. На рис. 1 представлены результаты исследования экспрессии гена ингибитора апоптоза *Bcl-2* гена *IL-8* в нормальных и опухолевых тканях тела матки, опухоли шейки матки и культурах фибробластов человека. Уровни экспрессии исследуемых генов нормировали относительно уровня экспрессии гена “домашнего хозяйства” циклофилина. Исследование экспрессии гена *Bcl-2* и

фактора роста *IL-8* в операционном материале больных раком матки показало, что во всех образцах в опухолевой ткани регистрируется повышенная в сравнении с нормальной тканью экспрессия гена *Bcl-2* (рис. 1А), а экспрессия гена *IL-8* регистрируется в опухолевых тканях матки (рис. 1Б, дорожки 1, 2, 3, 7, 9), в отличие от нормальной ткани (дорожки 4–6) и культур фибробластов (дорожки 10–12).

Отмечающийся за последние годы рост частоты опухолей щитовидной железы и трудность их распознавания на ранних стадиях заставляют ориентировать молекулярные исследования на опухоли этого органа. В структуре заболеваемости рак щитовидной железы входит в десятку самых распространенных форм злокачественных опухолей в Новосибирской области. Заболеваемость раком щитовидной железы в Новосибирске за 1998 г. составила 4,6 на 100 тыс. населения, а за 2002 г. – уже 7,1.

Мы исследовали экспрессию генов *Bcl-2* и *VEGF* (вазкулярный эндотелиальный фактор роста) в нормальных и опухолевых тканях щитовидной железы в операционном материале больных с опухолями щитовидной железы. Уровни экспрессии выбранных генов также оценивали относительно экспрессии гена β-актина. Уровень экспрессии гена *Bcl-2* представлен на рис. 2А. В тканях папиллярного рака щитовидной железы наблюдается более выраженная экспрессия гена *Bcl-2* (больные № 2, 3), чем в нормальных тканях от тех же пациентов, а для фолликулярного рака отмечается противоположный эффект (больной № 1). Возможно, эти различия связаны с разными механизмами трансформации для этих типов опухолей. Для доброкачественных опухолей щитовидной железы (больные № 4–7) какой-либо закономерности в экспрессии генов *Bcl-2* по сравнению с нормальной тканью не выявлено. Скорее всего, белок *Bcl-2* не влияет на формирование доброкачественной опухоли щитовидной железы. Этот факт также может косвенно свидетельствовать о различных механизмах формирования исследуемых патологий.

Исследование гена *VEGF* показало, что его экспрессия наблюдается у больного фолликулярным раком (рис. 2Б). В остальных случаях экспрессия гена *VEGF* наблюдается только в нормальных тканях (рис. 2Б, больные № 3–7). Этот факт оказался неожиданным, поскольку, как правило, опухоли хорошо васкуляризованы. Вероятно, отсутствие экспрессии гена *VEGF* в исследованных опухолях может свидетельствовать о включении альтернативных путей ангиогенеза, характерных для метастазирования, которые не оценивались нами. Результаты проведенных оценок показывают, что экспрессия исследованных генов *Bcl-2* и *VEGF* по-разному меняется при разных формах рака щитовидной железы.

Таким образом, предварительные результаты свидетельствуют, что гены *Bcl-2*, *IL-8* и *VEGF* можно рассматривать как перспективные кандидаты в молекулярные маркеры для диагностики злокачественных опухолей матки и щитовидной железы.

Фармакогенетика онкозаболеваний

Изучение биохимической основы различий в терапевтических эффектах лекарств, проводившееся до начала 90-х годов XX века с применением, главным образом, либо оценок активности ферментов, участвующих

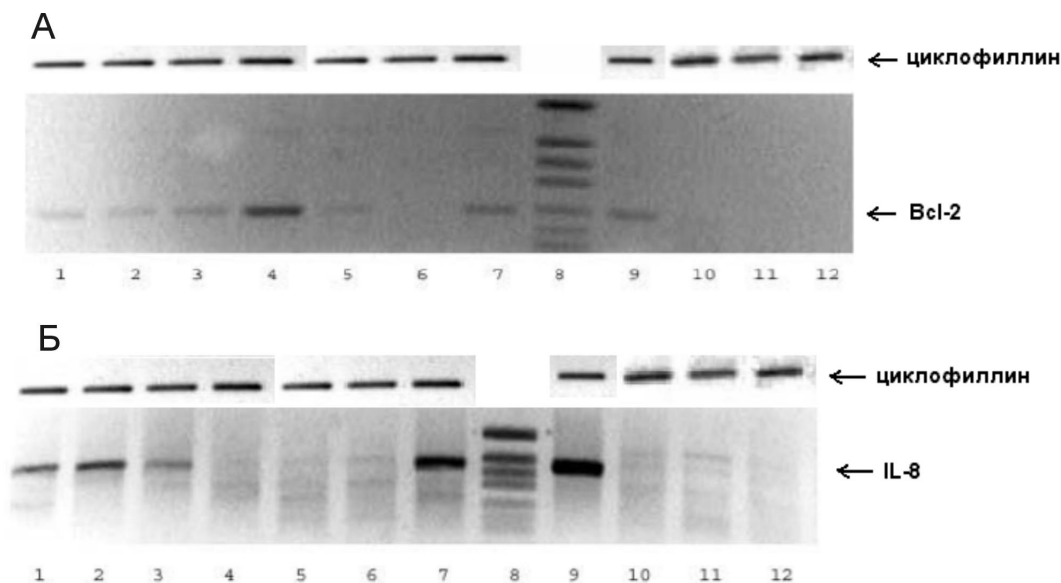


Рис. 1. Оценка экспрессии генов (А) – *Bcl-2* и (Б) – *IL-8*.

Дорожки 1–4 – опухоль тела матки; 5–7 – нормальная ткань тела матки; 8 – молекулярный маркер pBluescript II SK (+) / *MspI*; 9 – опухоль шейки матки; 10–12 – культуры клеток фибробластов человека ФЭЧ 16–1, ФЭЧ 16–2 и ФЭЧ Л68 соответственно

в их метаболизме *ex vivo*, либо по фармакокинетике лекарств в условиях *in vivo*, обосновало важную роль этапа биотрансформации лекарств и выявило многочисленные примеры генетического полиморфизма ферментов метаболизма лекарств, драматически сказывающихся на лекарственном ответе. Вторая половина 90-х годов характеризуется возрастающими объемами исследований ферментов транспорта и молекулярных мишеней лекарств.

В числе первых большой интерес у исследователей вызывают гены, связанные с “множественной лекарственной устойчивостью”, – феноменом, актуальным в терапии злокачественных опухолей.

Одним из этих генов, обуславливающих формирование множественной лекарственной устойчивости, является ген *MDR1*, кодирующий белок транспорта лекарств Р-гликопротеин. Ген *MDR1* полиморфен и имеет 28 однонуклеотидных замен. Показано, что синонимичная однонуклеотидная замена в 26-м экзоне (3435 C→T) гена *MDR1* связана со снижением экспрессии Р-гликопротеина в клетках слизистой двенадцатиперстной кишки у пациентов с T/T³⁴³⁵ генотипом [16]. Этот же полиморфизм сопровождается увеличением активности Р-гликопротеина в клетках NK-киллеров человека (CD56). Обнаружена более высокая биодоступность дигоксина (субстрат Р-гликопротеина) у субъектов с T/T³⁴³⁵ генотипом.

Проведенный нами анализ ассоциаций между генетическими вариантами в экзонах 21 и 26 гена *MDR1* и эффектом от химиотерапии больных с лимфопролиферативными заболеваниями (табл. 2) показал, что для больных с генотипом T/T²⁶⁷⁷ вероятность быть устойчивыми к химиотерапии в

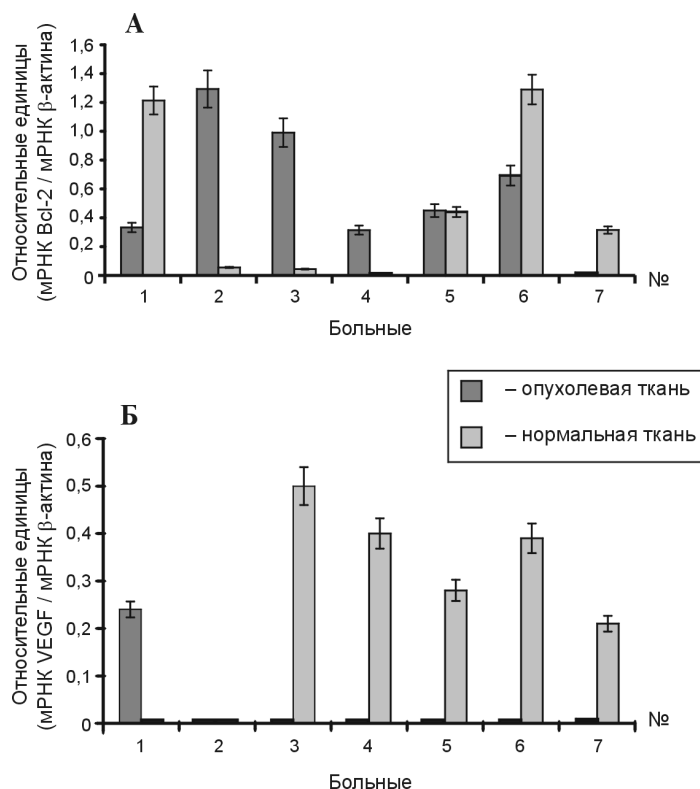


Рис. 2. Уровень экспрессии генов (А) – *Bcl-2* и (Б) – *VEGF* в опухолевых и нормальных тканях щитовидной железы.

А – № 1 – фолликулярный рак; № 2, 3 – папиллярный рак; № 4–7 – нормальная ткань щитовидной железы. Б – № 1 – фолликулярный рак; № 2 – папиллярный рак; № 3–7 – нормальная ткань щитовидной железы

4,5 раза выше по сравнению с индивидуумами с G/G²⁶⁷⁷ генотипом и в 6,8 раза выше в сравнении с больными, имеющими один или оба G²⁶⁷⁷-аллеля. Аналогичная связь прослеживается для больных с генотипом T/T³⁴³⁵: вероятность устойчивости к химиотерапии у них в 6,3 раза выше, чем у больных с генотипом C/C³⁴³⁵, и еще более выше по сравнению с больными, имеющими один или оба C-аллеля в генотипе. Кроме того, если больной имеет гаплотип T/T²⁶⁷⁷ T/T³⁴³⁵, то риск быть устойчивым к химиотерапии у него в 10 раз выше, чем у больного с гаплотипом G/G²⁶⁷⁷ C/C³⁴³⁵, а по отношению к больным с другими гаплотипами – в 17 раз.

Таким образом, сопоставление генетического полиморфизма *MDR1* с лекарственной устойчивостью новообразований лимфоидного происхождения показало, что G²⁶⁷⁷T и C³⁴³⁵T полиморфизмы гена *MDR1* влияют на результат терапии у пациентов с хроническими лимфопролиферативными заболеваниями. Поэтому знание генотипа *MDR1* таких больных важно для прогноза и выбора терапии.

Ген фермента II фазы биотрансформации лекарств GSTπ входит в число генов, с которыми также связывают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток [26]. Ген *GSTP1* имеет мутации в экзонах 5 и 6, которые приводят к замене в кодоне 105 аминокислоты Ile на Val, и в кодоне 114 Ala на Val соответственно.

Исследование роли полиморфных вариантов гена *GSTP1* в формировании лекарственной устойчивости больных с лимфопролиферативными заболеваниями выявило риск устойчивости к химиотерапии у носителей мутантного аллеля в 5-м экзоне гена *GSTP1*, который был в 2,79 раза выше по сравнению с индивидуумами, являющимися гомозиготами “дикого” генотипа (табл. 3).

Тот факт, что среди обследованных нами больных лимфопролиферативными заболеваниями, устойчивых к химиотерапии, преобладают носители мутантных аллелей генов *MDR1* и *GSTP1*, дает основание предположить, что мутантные аллели генов кодируют белки с более высокой активностью по отношению к противоопухолевым препаратам. Функциональное значение мутаций в генах, определяющих фенотип множественной лекарственной устойчивости, мало изучено. Есть данные о повышенной активности *GSTP1* в отношении эпоксидов полиароматических соединений при наличии аллеля Val105 [17]. В работе [15] исследовалась функциональная активность Р-гликопротеина в лимфоцитах у пациентов с учетом полиморфизма *MDR1* в 26-м экзоне. Она оказалась

выше в случае мутантного генотипа T/T³⁴³⁵ по сравнению с “диким” C/C³⁴³⁵, а уровень мРНК, наоборот, был ниже в лимфоцитах пациентов с T/T³⁴³⁵ генотипом по сравнению с C/C³⁴³⁵ генотипом.

Мы проанализировали, как уровень экспрессии генов *MDR1* и *GSTP1* и активность Р-гликопротеина влияют на фенотип множественной лекарственной устойчивости у больных лимфопролиферативными заболеваниями. При анализе уровней экспрессии мРНК *MDR1* и *GSTP1* в костном мозге больных лимфопролиферативными заболеваниями не выявлено достоверных различий в экспрессии мРНК *MDR1* и *GSTP1* между чувствительными и устойчивыми к химиотерапии больными (табл. 4). В то же время функциональная активность Р-гликопротеина была повышенной в лимфоцитах устойчивых к химиотерапии больных, в сравнении с лимфоцитами тех, кто имел хороший ответ на лечение химиопрепаратами (табл. 4).

Таким образом, для прогноза эффективности терапии онкогематологических больных важно знание их генотипов *MDR1* и *GSTP1*.

Представленный выше материал иллюстрирует основополагающее положение фармакогенетики о влиянии генетических факторов на лекарственный ответ. Классическая фармакогенетика рассматривает генотип пациента как существенный элемент в корректном выборе вариантов медикаментозного лечения. В то же время в клетках опухоли, как правило, происходят значительные реорганизации генома, поэтому и ответ клеток опухоли на медикаментозное лечение определяется не только генотипом пациента, но и генотипом опухолевых клеток.

Наиболее ясные результаты по связи генотипа опухоли с оптимальным вариантом терапии получены в последнее время в исследованиях, связанных с анализом дозы гена *HER2/neu* [2, 23]. Клетки многих злокачест-

Таблица 2

Ассоциация генотипов гена *MDR1* с устойчивостью к химиотерапии больных лимфопролиферативными заболеваниями (n=53)

Генотип	Комбинации генотипов, относительно которых считалось ОШ	Отношение шансов	Уровень значимости различий
T/T ²⁶⁷⁷	G/G ²⁶⁷⁷	4,5	p<0,05
	G/G ²⁶⁷⁷ +G/T ²⁶⁷⁷	6,8	p<0,0084
T/T ³⁴³⁵	C/C ³⁴³⁵	6,3	p<0,023
	C/C ³⁴³⁵ +C/T ³⁴³⁵	10,08	p<0,024
T/T ²⁶⁷⁷ +T/T ³⁴³⁵	G/G ²⁶⁷⁷ + C/C ³⁴³⁵	10,50	p<0,007
	Все, кроме T/T ²⁶⁷⁷ + T/T ³⁴³⁵	17,73	p<0,00045

Таблица 3

Ассоциация генотипов гена *GSTP1* с устойчивостью к химиотерапии больных лимфопролиферативными заболеваниями

Экзоны гена <i>GSTP1</i>	Генотипы <i>GSTP1</i>	N	Генотипы, относительно которых считалось ОШ	Отношение шансов	Уровень значимости различий
5	Val105Val + Ile105Val	76	Ile105Ile	2,79	p<0,1
6	Val114Val + Ala114Val	38	Ala114Ala	1,6	p<0,47

венных опухолей (прежде всего при раке молочной железы) содержат на поверхности увеличенное количество рецепторов HER2. Причиной такой гиперэкспрессии является, как правило, увеличенная доза гена *HER2*. Гиперэкспрессия рецептора HER2 характеризует опухоль как агрессивную, но в то же время эффективно отвечающую на лечение антителами к рецептору HER2. Генно-инженерно-модифицированные (“гуманизированные”) моноклональные антитела к рецепторам HER2 лежат в основе эффективного препарата нового поколения – Герцептин [11]. Использование Герцептина обосновано только в случаях опухолей с гиперэкспрессией рецепторов на поверхности опухолевых клеток.

Проанализировать количество рецепторов можно с помощью иммуноферментных методов, однако часто результаты, полученные с помощью таких методов, неточны из-за наличия на поверхности клеток опухоли близких по структуре рецепторов. Поскольку в основе гиперэкспрессии рецептора HER2 лежит увеличение дозы гена, кодирующего рецептор, альтернативой иммуноферментным методам стал метод FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*). Однако FISH требует достаточно специализированных исследований и всегда остаётся качественным, а не количественным [21, 24].

Нами предложено определять дозу гена *HER2* с помощью конкурентной ПЦР, при которой одновременно амплифицируется фрагмент гена *HER2* с использованием ДНК-матрицы из клеток опухоли и генно-инженерно-конструированный фрагмент ДНК (референс-ДНК), позволяющий оценивать количество исследуемой геномной ДНК, а стало быть, и дозу гена. На рис. 3 показано, как этим способом возможно выявление пациентов, у которых клетки опухоли гиперэкспрессируют рецепторы HER2, лечение которых Герцептином может быть очень эффективно. Референс-ДНК сконструирована таким образом, что амплификация происходит с тех же праймеров, что и для фрагмента гена *HER2*, однако размер ампликона, полученного с референс-ДНК, отличается от амплифицируемого фрагмента гена *HER2*. Амплификация известного количества референс-ДНК (фрагмента гена *HER2* с инсерцией) совместно с геномной ДНК позволяет отслеживать копияность гена *HER2* в исследуемых образцах.

Экспрессия мРНК *MDR1* и *GSTP1* в костном мозге и функциональная активность Р-гликопротеина в лимфоцитах крови ($M \pm m$) у больных лимфопролиферативными заболеваниями, чувствительных и устойчивых к химиотерапии

Показатели	Уровень экспрессии генов МЛУ (мРНК гена МЛУ/мРНК гена β -актина)	
	Чувствительные к химиотерапии больные	Устойчивые к химиотерапии больные
мРНК <i>MDR1</i>	0,19 \pm 0,06 (n=7)	0,27 \pm 0,06 (n=18)
мРНК <i>GSTP1</i>	0,77 \pm 0,10 (n=7)	0,76 \pm 0,09 (n=18)
Функциональная активность по выбросу Rh 123 (относит. ед)		
Р-гликопротеин	1,57 \pm 0,22 (n=7)	2,44 \pm 0,5* (n=4)

Таким образом, накопленные современные знания о механизмах канцерогенеза свидетельствуют о чрезвычайной сложности этого процесса. Полная картина станет результатом обширных будущих исследований. В то же время современные представления о стадийности канцерогенеза позволяют рационально, с точки зрения таких задач медицины, как профилактика, диагностика и лечение онкологических заболеваний, направлять наши усилия на поиск информативных маркеров всех основных его стадий. Именно к этому мы стремились в наших исследованиях.

GENOME MEDICINE AND NEW APPROACHES TO ONCOLOGICAL DISEASES DIAGNOSTICS AND TREATMENT

V.V. Lyakhovich, V.A. Vavilin, A.Yu. Grishanova, L.F. Gulyaeva, S.P. Kovalenko

The current trends of genomic research in oncology are reviewed. Original results on the lung cancer predisposition of xenobiotic metabolism genes polymorphisms (*CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2*) are presented. Expressions of apoptosis-related and angiogenesis-related genes (*IL-8*, *Bcl-2*, *VEGF*) in endometrial, cervical and thyroid cancers are investigated. Multidrug resistance gene polymorphisms (*MDR1* and *GSTP1*) and P-glycoprotein activity are estimated in connection with the effectiveness of anticancer drugs treatment in patients with lymphoproliferative diseases. PCR- approach to the *her2* gene dosage estimation is described. The dosage of *HER2* gene is a valuable indicator of the cytostatic drug choice for breast tumor treatment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexandrie A.-K., Ingelman Sundberg M., Seidegard J. et al. // *Carcinogenesis*. 1994. № 9. P. 1785–1790.
2. Arteaga C.L. // *The Oncologist*. 2002. Vol. 7. Suppl. 4. P. 31–39.
3. Brockmoller J., Cascorbi I., Kerb R. and Roots I. // *Cancer Res*. 1996. Vol. 56. P. 3915–3925.
4. Drakoulis N., Cascorbi I., Brockmoller J. et al. // *Clin. Invest*. 1994. Vol. 72. P. 240–248.
5. Folkman J. // *Curr. Mol. Med*. 2003. Vol. 3. P. 643–651.
6. Franks L.M., Teich N.M. // *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. New-York. 1999. 485 p.
7. Fretland A.J., Leff M.A., Doll M.A., Hein D.W. // *Pharmacogenetics*. 2001. Vol. 11. № 3. P. 207–215.
8. Garte S. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2001. Vol. 10. № 12. P. 1233–1237.
9. Gil J.P., Lechner M.C. // *Carcinogenesis*. 1998. Vol. 19. № 1. P. 37–41.
10. Glenjen N., Hovland R., Wergeland L. et al. // *Eur. J. Haematol*. 2003. Vol. 71. P. 163–173.
11. Harries M., Smith I. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2002. Vol. 9. № 2. P. 75–85.
12. Hayashi S., Watanabe J., Kawajiri K. // *Jpn. J. Cancer Res*. 1992. Vol. 83. P. 866–870.

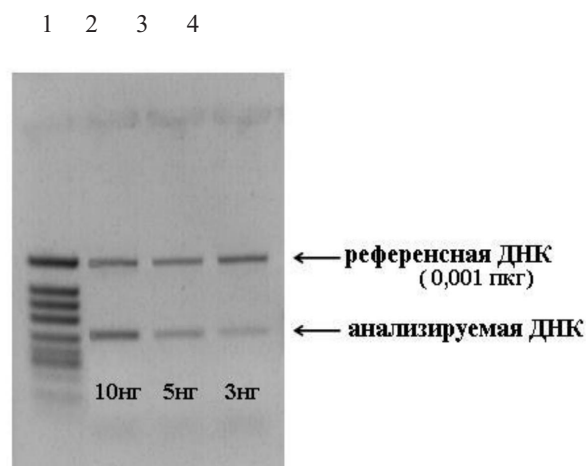


Рис. 3. Оценка количества копий гена *her-2* с помощью совместной амплификации исследуемого образца и референс-ДНК.

Дорожка 1 – маркер молекулярного веса ДНК pBluescript II SK (+)/MspI; дорожки 2, 3, 4 – амплификация различных количеств геномной ДНК (10 нг, 5 нг и 3 нг) совместно с референс-ДНК (0,001 пкг)

13. Hein D.W., Grant D.M., Sim E. // *Pharmacogenetics*. 2000. Vol. 10. № 4. P. 291–292.
14. Hein D.W. // *Mutat Res*. 2002. Vol. 506–507. P. 65–77.

15. Hitzl M., Drescher S., van der Kuip H. et al. // *Pharmacogenetics*. 2001. Vol. 11. № 4. P. 293–298.
16. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97. № 7. P. 3473–3478.
17. Hu X., Xia H., Srivastava S.K. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 238. P. 397–402.
18. IARC. *Cancer: causes, occurrence and control*. Ed.: Tomatis L. IARC Sci. Publ. № 100. Lyon, 1990. 383 p.
19. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K. et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1993a. Vol. 14. P. 77–87.
20. Kawajiri K., Nakachi K., Imai K. et al. // *Carcinogenesis*. 1993b. Vol. 14. P. 1085–1089.
21. Larsimont D., Di Leo A., Rouas G. et al. // *Anticancer Res*. 2002. Vol. 22. № 4. P. 2485–2490.
22. Marcus P.M., Hayes R.B., Vineis P. et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevent.* 2000. Vol. 9. № 5. P. 461–467.
23. Masood S., Bui M.M. // *Microsc. Res. Tech.* 2002. Vol. 59. № 2. P. 102–108.
24. Mueller R.E., O'Malley F.P. // *Methods Mol Biol*. 2002. Vol. 204. P. 353–367.
25. Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R. et al. // *Biochem. J.* 1994. Vol. 300. Pt. 1. P. 271–276.
26. Ribrag V., Massade L., Faussat A.M. // *Leukemia*. 1996. Vol. 10. № 12. P. 1944–1949.
27. Soares P., Fonseca E. et al. // *Eur. J. Cancer*. 1997. Vol. 32. P. 293–296.
28. Zhong S., Wyllie A.H., Barnes D., Wolf C.R., Spurr N.K. // *Carcinogenesis*. 1993. Vol. 14. P. 1821–1824.