

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА РЕПАРАЦІЇ ДНК *XPD* У ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ БЕЗ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ В АНАМНЕЗІ

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМНУ» (м. Київ)

*** ДУ «Інститут спадкової патології НАМНУ» (м. Львів)**

Робота виконана в межах НДР «Дослідження значення поліморфізму генів репарації ДНК *XRCC1* та *XPD* у дестабілізації геному соматичних клітин в осіб, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС і захворіли на рак щитоподібної залози, № держ. реєстрації 0111U000756.

Вступ. Рак щитоподібної залози (РЩЗ) складає менше 1% усіх випадків онкопатології людини, проте вважається однією із найчастіших ендокринних неоплазій. Вплив іонізуючого випромінювання (ІВ) вважається верифікованим чинником канцерогенезу щитоподібної залози, особливо в молодому віці; також підтверджується зв'язок аліментарного йодного дефіциту із цією патологією. За останні роки ідентифіковано десятки поліморфних генів кандидатів, які можуть приймати участь у формуванні онкологічного ризику. Більшість з цих генів мають низьку пенетрантність по відношенню до злоякісних новоутворень, але частота поширення їх поліморфних варіантів в популяції може досягати високих значень. Особливе місце серед генів-модифікаторів мають гени репарації ДНК, до яких відноситься ген *XPD* [4]. Продукт гена *XPD* (xeroderma pigmentosum group D) функціонує в якості допоміжного фактора РНК-полімерази II. Крім цього він є необхідним в ексцизійній репарації нуклеотидів. Багатоплановість ролі білка *XPD* в процесах транскрипції і репарації ДНК підкреслюється значенням поліморфного статусу цього гену в схильності до онкопатології [2,14]. Носійство поліморфних алелей цього гена збільшує ризик розвитку раку молочної залози [8], раку гортані [7], раку легенів [1]. За результатами мета-аналізу літературних джерел Qiu L. та співавт. [8] приходять до висновку, що *XPD* ген є низькопенетрантним фактором ризику розвитку раку молочної залози. Разом з тим, не виявлено асоціації поліморфізму гена *XPD* з ризиком колоректального раку в Польській популяції [12].

В дослідженні S. N. Silva та співавт. встановлено, що поліморфні варіанти гена *XPD* пов'язані із підвищеним ризиком виникнення папілярної форми раку щитоподібної залози, проте необхідні подальші дослідження, щоб підтвердити отримані результати [11].

За результатами одних досліджень показано асоціацію поліморфізмів гена *XPD* з ризиком розвитку раку молочної залози саме в умовах дії іонізуючого випромінювання, а не в популяції в цілому [10, 5, 9]. В дослідженні Чумак А. А. і співавт. [3] не виявлено розбіжностей у розподілі окремих варіантів гена *XPD* у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, залежно від радіаційного анамнезу.

Метою роботи було встановлення взаємозв'язку поліморфізму *Lys751Gln* гена репарації ДНК *XPD* з ризиком розвитку раку щитоподібної залози у хворих без впливу іонізуючого випромінювання в анамнезі.

Об'єкт і методи дослідження. Визначення поліморфізму *Lys751Gln* гена *XPD* проведено у 64 хворих на рак щитоподібної залози без впливу іонізуючого випромінювання в анамнезі – 14 чоловіків (22%) та 50 жінок (78%) у віці від 14 до 78 років, середній вік – $46,8 \pm 14,7$ років, медіана – 49,5 років. Для порівняння отриманих даних щодо спонтанного раку щитоподібної залози та розрахунків відмінностей частот алелей і ризику виникнення онкопатології використовували дані літератури щодо контрольних груп популяцій Польщі [12, 6]. При оцінці ризиків щодо поліморфізму *XPD* – дані літератури по польській популяції без онкопатології (36 чоловіків і 64 жінки, медіана віку 65 років) [12].

Геномна ДНК екстрагувалась із мононуклеарів периферійної крові з використанням набору для виділення ДНК Neoprep DNA Magnet (Neogene, Україна) згідно інструкції виробника. Для визначення поліморфізму гену *XPD Lys751Gln* використовували таку послідовність праймерів: прямий (5'-TCAAACATCCTGTCCCTACT-3') і зворотний (5'-CTGCGATTAAGGCTGTGGA-3'). ПЛР здійснювали в кінцевому об'ємі 20 мкл, який містив приблизно 20 нг досліджуваного ДНК, 10,0 пмоль кожного із праймерів, з використанням буфера, наданого виробником. Для ампліфікації використовували набір реагентів для ПЛР ампліфікації ДНК GenPak®PCR Core (Neogene, Україна), згідно інструкції виробника.

Визначення частоти поліморфних алелей та відповідності розподілу генотипів оцінювалось за ривнянням Харді-Вайнберга. Враховували частоту

Розподіл окремих поліморфізмів Lys751Gln гена XPD, частота варіантної алелі гена XPD та відповідність розподілу генотипів рівнянню Харді-Вайнберга серед обстежених осіб, кількість хворих (%)

Група	XPD генотип				χ^2 , p
	Lys751Lys	Lys751Gln	Gln751Gln	V алель	
хворі на РЩЗ, без впливу ІВ в анамнезі, n = 64	20(31,24)	38 (59,38)	6 (9,38)	0,39	3,91 p < 0,05

алелей та генотипів. Відмінності між частотами алелей в різних групах та в розподілі частот генотипів розраховували з використанням критерію χ^2 з поправкою Йетса на безперервність варіації та точного двостороннього критерію Фішера. Відповідність розподілу частоти генотипів рівновазі Харді-Вайнберга оцінювали за допомогою порівняння очікуваної та емпіричної частоти генотипів. Аналіз проводили базуючись на розрахунках теоретично очікуваного розподілу кожного з трьох генотипів, виходячи з припущення, що дані інших двох є точними (<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>). Статистичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням пакету програм Statistica Base "Basic Statistical Analysis Methods".

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що у досліджуваній групі співвідношення гомозигот за мажорним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем становить 31,24%, 59,38% і 9,38%. Частота V алеля становила 0,39 (χ^2 3,91, p < 0,05).

Узагальнені дані аналізу розподілу окремих генотипів за поліморфізмом Lys751Gln гена XPD та його відповідності рівнянню Харді-Вайнберга представлено в **таблиці 1**.

Розподіл частот генотипів у досліджуваній групі хворих на РЩЗ, без впливу ІВ в анамнезі порівнювали із даними літератури у трьох групах: із Польщі (група осіб без онкопатології), та у двох групах здорових осіб із Великої Британії та Швеції.

В групі осіб без онкопатології (Польща) співвідношення гомозигот за мажорним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем становить 42,0%, 41,0% та 17,0%. Частота V алеля становила 0,38. Не знайдено відмінностей по розподілу частот генотипів при порівнянні досліджуваної групи хворих на РЩЗ та групи осіб без онкопатології із Польщі. Співвідношення шансів (OR) становило – 1,980 (CI95% 0,680 – 6,018). Відносний ризик (RR) виникнення раку щитоподібної залози становив – 1,092

Таблиця 1 (CI95% 0,946 – 1,205). Критерій Фішера – 0,249.

В групі здорових осіб (Швеція) співвідношення гомозигот за мажорним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем становить 40,7%, 44,4% та 14,8%. Частота V алеля становила 0,37. Не знайдено відмінностей по розподілу частот генотипів при порівнянні досліджуваної групи хворих на РЩЗ та групи здорових осіб із Швеції.

Співвідношення шансів (OR) становило – 1,681 (CI95% 0,610 – 4,864). Відносний ризик (RR) становив – 1,064 (CI95% 0,931 – 1. 155). Критерій Фішера – 0,384.

В групі здорових осіб (Велика Британія) співвідношення гомозигот за мажорним алелем, гетерозигот і гомозигот за мінорним алелем становить 41,1%, 43,8% та 15,1%. Частота V алеля становила 0,37. Не знайдено відмінностей по розподілу частот генотипів при порівнянні досліджуваної групи хворих на РЩЗ та групи здорових осіб із Великої Британії.

Співвідношення шансів (OR) становило – 1,715 (CI95% 0. 540 – 5. 622). Відносний ризик (RR) становив – 1,067 (CI95% 0. 927 – 1. 193). Критерій Фішера – 0. 437.

В групі хворих на РЩЗ без впливу ІВ в анамнезі розподіл генотипів вірогідно не відповідав рівнянню Харді-Вайнберга (**табл. 1**). Слід зазначити, що

Таблиця 2

Емпіричний та очікуваний розподіл генотипів поліморфізмів Lys751Gln гена XPD у хворих на РЩЗ, без впливу ІВ в анамнезі

Генотип	Емпіричні	Очікувані
Гомозиготи Lys751 Lys	20	23,77
Гетерозиготи Lys751Gln	38	30,47
Гомозиготи Gln 751Gln	6	9,77

Таблиця 3

Розподіл окремих поліморфізмів Lys751Gln гена XPD, частота варіантної алелі гена XPD та відповідність розподілу генотипів рівнянню Харді-Вайнберга за даними літератури [12, 6, 13], кількість хворих (%)

Група	XPD генотип				p
	Lys751Lys	Lys751Gln	Gln751Gln	V алель	
група осіб без онкопатології, Польща, n = 100 [12]	42 (42)	41 (41)	17 (17)	0,38	p > 0,05
група здорових осіб, Швеція; n = 162 [6]	66 (40,7)	72 (44,4)	24 (14,8)	0,37	p > 0,05
група здорових осіб, Велика Британія, n = 73 [13]	30 (41,1)	32 (43,8)	11 (15,1)	0,37	p > 0,05

Вірогідність відмінностей в частоті варіантної алелі гена *XPD Lys751Gln* між групами обстежених осіб та даними літератури [12, 6, 13] щодо здорових осіб Західно-Європейських популяцій

Група	Частота варіантної алелі гена <i>XPD Lys751Gln</i>	p
хворі на РЩЗ, без впливу ІВ в анамнезі, n = 64	0,39	p ₁ = 0,75 p ₂ = 0,80 p ₃ = 0,83
група здорових осіб, Швеція, n = 162 [6]	0,37	-
група здорових осіб, Велика Британія, n = 73 [13]	0,37	-
група осіб без онкопатології, Польща, n = 100 [12]	0,38	-

Примітка: p₁ – вірогідність відмінностей між показниками групи обстежених осіб порівняно з групою здорових осіб, Швеція [6]; p₂ – вірогідність відмінностей між показниками групи обстежених осіб порівняно з групою здорових осіб, Велика Британія [13]; p₃ – вірогідність відмінностей між показниками групи обстежених осіб порівняно з групою осіб без онкопатології, Польща [12].

отримані значення $\chi^2 = 3,91$ знаходяться на межі критичного значення $\chi^2_{\text{крит}} = 3,84$, тому виявлена невідповідність може мати випадковий характер. Як видно з **таблиці 1**, основним фактором невідповідності розподілу генотипів рівнянню Харді-Вайнберга може бути більша кількість гетерозигот при пропорційно меншій кількості гомозигот обох типів в дослідженій групі.

В **таблиці 2** представлено емпіричний та очікуваний розподіл генотипів поліморфізмів *Lys751Gln* гена *XPD* у досліджуваній групі хворих на РЩЗ без впливу ІВ в анамнезі.

Таблиця 4

В **таблиці 3** представлено розподіл окремих поліморфізмів *Lys751Gln* гена *XPD* у трьох групах: із Польщі (група осіб без онкопатології), та у двох групах здорових осіб із Великої Британії та Швеції.

У **таблиці 4** вказано вірогідність відмінностей в частоті варіантної алелі гена *XPD Lys751Gln* між групами обстежених осіб та даними літератури щодо здорових осіб Західно-Європейських популяцій.

Висновки. Не було виявлено асоціації поліморфізму гена *XPD Lys751Gln* з ризиком розвитку спонтанного раку щитоподібної залози у групі хворих на РЩЗ. Отримані результати по розподілу частот генотипів гена *XPD* у групі хворих на рак щитоподібної залози співпадають із даними літератури по розподілу частот генотипів гена *XPD* у європейських популяціях, з якими

було проведено порівняння. Саме це може бути підґрунтям адекватності проведених розрахунків на першому етапі роботи, адже в якості контрольної групи були обрані результати дослідження польської популяції.

Перспективи подальших досліджень. Визначення особливостей поліморфізму гена репарації *XPD Lys751Gln* у хворих на рак щитоподібної залози, які зазнали дії іонізуючої радіації внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС та їх порівняння з отриманими даними у хворих без впливу іонізуючого випромінювання в анамнезі та з контрольною групою популяції України.

Література

1. Журавлева Ю. А. Полиморфизм генов ферментов репарации ДНК у больных раком легкого / Ю. А. Журавлева, В. И. Минина, Р. А. Титов [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2012. Приложение 1. – С. 68.
2. Турусов В. С. Химический канцерогенез / В. С. Турусов // Канцерогенез под ред. Д. Г. Заридзе. – М. : Медицина, 2004. – С. 204–250.
3. Чумак А. А. Вплив поліморфізмів генів, що кодують білки репарації ДНК, на ризик розвитку хронічної лімфоцитарної лейкемії в учасників ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи / А. А. Чумак, Н. І. Білоус, І. В. Абраменко [та ін.] // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2010. – Вип. 27. – С. 210–215.
4. Benhamou S. ERCC2/XPB gene polymorphisms and cancer risk / S. Benhamou, A. Sarasin // Mutagenesis. – 2002. – Vol. 17. Iss. 6. – P. 463-469.
5. Bhatti P. Polymorphisms in DNA repair genes, ionizing radiation exposure and risk of breast cancer in U. S. Radiologic technologists / P. Bhatti, J. P. Struewing, B. H. Alexander [et al.] // Int. J. Cancer. – 2008. – Vol. 122, № 1. – P. 177 – 182.
6. Capella G. DNA repair polymorphisms and the risk of stomach adenocarcinoma and severe chronic gastritis in the EPIC-EURGAST study / G. Capella, G. Pera, N. Sala [et al.] // Int. J. Epidemiol. – 2008. – Vol. 37, № 37. – P. 1316 – 1325.
7. Gajecka M. Reduced DNA Repair Capacity in Laryngeal Cancer Subjects / M. Gajecka, M. Rydzanicz, R. Jaskula-Sztul [et al.] // Current Research in Head and Neck Cancer. – 2005. – Vol. 62. – P. 25–37.
8. Qiu L. XPD Lys751Gln polymorphism and breast cancer susceptibility: a meta-analysis involving 28,709 subjects / L. Qiu, Yao L., Zhang J. [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. – 2010. – Vol. 124, № 1. – P. 229–235.
9. Rajaraman P. Nucleotide excision repair polymorphisms may modify ionizing radiation-related breast cancer risk in US radiologic technologists / P. Rajaraman, P. Bhatti, M. M. Doody [et al.] // Int. J. Cancer. – 2008. – Vol. 123, № 11. – P. 2713–2716.
10. Sigurdson A. J. Polymorphisms in apoptosis- and proliferation-related genes, ionizing radiation exposure, and risk of breast cancer among U. S. Radiologic Technologists / A. J. Sigurdson, P. Bhatti, M. M. Doody [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2007. – Vol. 16, № 10. – P. 2000–2007.
11. Silva S. N. Association of Polymorphisms in ERCC2 Gene with Non-Familial Thyroid Cancer Risk / S. N. Silva, O. M. Gil, V. C. Oliveira [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. – 2005. – Vol. 14 (10). – P. 2407-2412.
12. Sliwinski T. Common polymorphisms in the XPD and hOGG1 genes are not associated with the risk of colorectal cancer in a Polish population / T. Sliwinski // Tohoku J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 218. – P. 185–191.

13. Winsley S. L A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer / S. L. Winsley, N. A. Haldar, H. P. Marsh // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, № 20. – P. 5612–5616.
14. Wu X. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes / X. Wu // *Am. J. Human Genetics.* – 2006. – Vol. 78. – P. 464–479.

УДК 616. 441 – 006. 6 : 575. 113. 2

АЛЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА РЕПАРАЦІЇ ДНК XPD У ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ БЕЗ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ В АНАМНЕЗІ

Шкарупа В. М., Генік-Березовська С. О., Неумержицька Л. В., Клименко С. В.

Резюме. Метою роботи було встановлення взаємозв'язку поліморфізму Lys751Gln гена репарації ДНК XPD з ризиком розвитку раку щитоподібної залози (РЩЗ) у хворих без впливу іонізуючого випромінювання в анамнезі. Визначення поліморфізму гену XPD Lys751Gln проводилось шляхом ПЛР у 64 хворих на рак щитоподібної залози без впливу іонізуючого випромінювання (ІВ) в анамнезі. В групі хворих на РЩЗ без впливу ІВ в анамнезі розподіл генотипів вірогідно не відповідав рівнянню Харді-Вайнберга. Не було виявлено асоціації поліморфізму гена XPD Lys751Gln з ризиком розвитку спонтанного раку щитоподібної залози у групі хворих на РЩЗ. Отримані результати по розподілу частот генотипів гена XPD у групі хворих на рак щитоподібної залози співпадають із даними літератури по розподілу частот генотипів гена XPD у європейських популяціях, з якими було проведено порівняння.

Ключові слова: ген XPD, іонізуюче випромінювання, рак щитоподібної залози.

УДК 616. 441 – 006. 6 : 575. 113. 2

АЛЛЕЛЬНИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕПАРАЦИИ ДНК XPD У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ БЕЗ ВЛИЯНИЯ ИОНИЗУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЕ В АНАМНЕЗЕ

Шкарупа В. М., Генік-Березовская С. А., Неумержицкая Л. В., Клименко С. В.

Резюме. Целью работы было установление взаимосвязи полиморфизма Lys751Gln гена репарации ДНК XPD с риском развития рака щитовидной железы (РЩЖ) у больных без влияния ионизирующего облучение (ИО) в анамнезе. Определение полиморфизма гену XPD Lys751Gln проводилось путем ПЦР у 64 больных на рак щитовидной железы без влияния ионизирующего облучение в анамнезе. В группе больных с РЩЖ без влияния ИО в анамнезе распределение генотипов достоверно не отвечало равеннию Харди-Вайнберга. Не было выявлено ассоциации полиморфизма гена XPD Lys751Gln с риском развития спонтанного рака щитовидной железы в группе больных РЩЖ. Полученные результаты по распределению частот генотипов гена XPD в группе больных раком щитовидной железы совпадают с данными литературы по распределению частот генотипов гена XPD в европейских популяциях, с которыми было проведено сравнение.

Ключевые слова: ген XPD, ионизирующее облучение, рак щитовидной железы.

UDC 616. 441 – 006. 6 : 575. 113. 2

Allelic Polymorphism of DNA Repair Gene XPD in Patients with Thyroid Cancer without Ionizing Radiation History

Shkarupa V. M., Henyk-Berezovska S. O., Neumerzhitska L. V., Klymenko S. V.

Abstract. Thyroid cancer (TC) is less than 1 % of all cases of cancer human pathology, but is considered one of the most common endocrine neoplasia. Effects of ionizing radiation (IR) is a verified factor in thyroid carcinogenesis, especially at a young age; also confirmed the connection of nutritional iodine deficiency with this disease. In recent years, several common low-penetrance genes that cause susceptibility to cancer were identified. The special place among those genes belongs to DNA reparation genes, which included XPD gene. The XPD gene product (xeroderma pigmentosum group D) functions as an auxiliary factor of RNA polymerase II. XPD protein is involved in transcription-coupled nucleotide excision repair. The carriage of polymorphic alleles of this gene increases the risk of breast cancer [8], laryngeal cancer [7], lung cancer [1]. According to the results of a meta-analysis Qiu L. et al. [8] conclude that XPD gene is low-penetrance risk factor for breast cancer. S. N. Silva et al. found, that polymorphic variants of XPD gene associated with increased risk of papillary thyroid cancer, but further studies are needed to confirm these results [11].

The aim of this work is to establish the relationship of polymorphism Lys751Gln of DNA repair gene XPD with the risk of thyroid cancer in patients without exposure to ionizing radiation in history. Materials and methods. The genotyping of polymorphism Lys751Gln of gene XPD was carried out in 64 patients with thyroid cancer without ionizing radiation history – 14 men (22%) and 50 women (78%) aged 14 to 78 years. For comparison of the data on spontaneous thyroid cancer and settlement of allele frequencies differences and risk of cancer pathology we used literature data on control groups of Polish populations [12, 6]. In assessing the risks of XPD polymorphism – literature data on the Polish population without cancer pathology (36 men and 64 women). PCR was performed in a final volume of 20 ml, containing approximately 20 ng of DNA studied, 10. 0 pmol of each primer, using the buffer provided by the manufacturer. The determining of polymorphic alleles frequency and genotypes distribution was assessed according for Hardy-Weinberg equation. Results and Discussion. We found that in the study group value

of homozygotes for major allele, heterozygotes and homozygotes for the minor allele is 31. 24%, 59. 38% and 9. 38%. V allele frequency was 0,39 (χ^2 3,91, $p < 0. 05$). The distribution of genotype frequencies in the study group of patients with thyroid cancer without exposure to ionizing radiation in history was compared with literature data in three groups: from Poland (group of individuals without cancer pathology), and in two groups of healthy individuals from the UK and Sweden. We have not found differences in the distribution of genotype frequencies comparing the study group of patients with thyroid cancer and a group of individuals without cancer pathology from Poland and groups of healthy individuals from Sweden and the UK. Among patients with thyroid cancer without ionizing radiation in history distribution of genotypes probably did not meet Hardy-Weinberg equation. It should be noted, that the values obtained $\chi^2 = 3,91$ on the verge of critical $\chi^2 = 3. 84$, so the discrepancy found may be random. The basic factor of disparity of genotypes distribution to Hardy-Weinberg equation can be a greater amount of heterozygotes at proportionally less amount of homozygotes of both types in an study group. Conclusions. There was found no association of polymorphisms Lys751Gln of the gene XPD with the risk of spontaneous thyroid cancer in patients with thyroid cancer. The obtained results for the distribution of genotypes frequencies of XPD gene in patients with thyroid cancer are consistent with the compared literature data on the distribution of genotypes frequency of XPD gene in European populations. Exactly this can be a basis of the adequacy of the conducted calculations in the first stage of work, because as a control group were selected results of research of the Polish population.

Keywords: XPD gene, ionizing radiation, thyroid cancer.

Рецензент – проф. Рибаків С. Й.

Стаття надійшла 19. 08. 2014 р.