

**МІЩУК Я.М.¹, ХАРКІВСЬКА Є.В.¹, СЕРГА С.В.¹, ШКЛЯР С.Є.¹, КАТРИЙ В.Б.¹,
КОЛЯДА О.К.², СТАХОВСЬКИЙ О.Е.³, СТАХОВСЬКИЙ Е.О.³, ВІТРУК Ю.В.³,
КОНОНЕНКО А.А.³, ДЕМИДОВ С.В.¹, ОСТАПЧЕНКО Л.І.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.^{1✉}**

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: slavamishchuk@gmail.com

² Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України,

Україна, 04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67, e-mail: alex.genetic@gmail.com

³ Національний інститут раку, Україна, 03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43,

e-mail: estakhovsky@yahoo.com

✉ iryna.kozeretska@gmail.com, (044) 522-39-95

ПОЛІМОРФІЗМ 399 КОДОНА ГЕНА XRCC1(RS2548) СЕРЕД НАСЕЛЕННЯ УКРАЇНИ

Рак сечового міхура (PCM) – найбільш поширений рак системи сечовивідних шляхів. Щороку у світі реєструється близько 380000 нових випадків та 150000 смертей від цього захворювання [1]. Частота розвитку PCM значно більша у чоловіків, ніж у жінок (співвідношення близько 3,5:1) і різко зростає з віком – 9 з 10 людей з діагностованою патологією віком від 65 років [2].

Відомо, що взаємодія між спадковими факторами та факторами зовнішнього середовища відіграє головну роль у виникненні та розвитку раку [3]. У більшості випадків розвиток PCM зумовлюється факторами зовнішнього середовища, а генетичні фактори, головним чином, відіграють роль у формуванні індивідуальної схильності до цього захворювання [4]. Серед зовнішніх факторів тютюнопаління – найбільш доведений фактор ризику розвитку PCM – є його причиною в 50–60 % випадків у чоловіків та 20–30 % у жінок. Професійний контакт із хімічними речовинами є другим важливим фактором, на частку якого припадає 25 % усіх випадків захворювання PCM [5].

Поліморфізми генів, залучених у репарацію ДНК, розглядаються як потенційні фактори модифікації індивідуального ризику розвитку раку [6]. XRCC1 залучений в ексцизійну репарацію основ (BER), де відіграє важливу роль, оскільки слугує платформою для DNA ligase III та POLB, а також є сенсором одноланцюгових розривів, оскільки взаємодіє з PARP [7].

Поліморфізм 399 кодона гена XRCC1 (rs25487) – це одонуклеотидний поліморфізм в 10 екзоні (G28152A), локалізований із СООН-кінця PARP-взаємодіючого домену білка, що зумовлює заміну Arg на Gln, проте, наслідки такої заміни залишаються досі остаточно не з'ясованими [6]. Вважають, що заміна зумовлює конформаційні зміни XRCC1 білка, що призводить до зменшення його афінності до мультикомпонентного білкового комплексу репарації ДНК [8].

Поширення Arg399Gln поліморфізму гена XRCC1 має етнічні особливості [9]. Частоти поліморфних варіантів 399 кодона варіюють у представників з Америки та Східної і Західної Європи, та значно відрізняються від таких у населення Азії [10].

Неодноразово повідомлялося про асоціацію поліморфізму Arg399Gln з різними типами раку [9, 11, 12], проте дані щодо раку сечового міхура залишаються неоднозначними [13–16]. Було показано асоціацію генотипу Gln/Gln зі зниженим ризиком розвитку раку сечового міхура [15–17]. Однак, дослідження [18] показує, що носії Gln/Gln мають значно вищий OR уротеліальної карциноми у порівнянні з носіями Arg/Arg та Arg/Gln, учені припускають, що це може бути асоційовано з підвищеною чутливістю до мутагенів, високим рівнем обміну сестринськими хроматидами, підвищеним рівнем ДНК-аддуктів та затримкою клітинного циклу. На противагу цьому, кілька мета-аналізів свідчать про відсут-

© МІЩУК Я.М., ХАРКІВСЬКА Є.В., СЕРГА С.В., ШКЛЯР С.Є., КАТРИЙ В.Б., КОЛЯДА О.К.,
СТАХОВСЬКИЙ О.Е., СТАХОВСЬКИЙ Е.О., ВІТРУК Ю.В., КОНОНЕНКО А.А., ДЕМИДОВ С.В.,
ОСТАПЧЕНКО Л.І., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

ність впливу такого поліморфізму на схильність до раку сечового міхура [19–21].

Є інформація з приводу впливу цього поліморфізму на ризик раку сечового міхура у курців. Показано, що генотип Gln/Gln асоційований зі зниженим ризиком розвитку РСМ у курців [15, 22, 23].

Оскільки відмінності у схильності до раку можуть пояснюватися комбінацією генетичних особливостей та факторів зовнішнього середовища, які відрізняються у представників різних етнічних груп [24], оскільки частоти алельних варіантів 399 кодона відрізняються у різних популяціях, то це може зумовлювати і відмінності у схильності до раку серед цих популяцій [25].

Матеріали і методи

У дослідження були залучені 111 людей із діагнозом карцинома сечового міхура віком від 28 до 76 років та 92 умовно здорових людей. Усі обстежувані є вихідцями і проживають на території України. Зразки для дослідження були надані з інформаційної згоди обстежуваних.

Виділення геномної ДНК проводили з периферійної крові за допомогою набору «ДНК-сорб В» («AmpliSens», Росія) за протоколом фірми-виробника.

Поліморфізм Arg399Gln гена *XRCC1* визначали за допомогою ПЛР з наступною рестрикцією продуктів реакції. Були використані такі праймери: 5'-GGA CTG TCA CCG CAT GCG TCG G-3' (прямий) та 5'-GGC TGG GAC CAC CTG TGT T-3' (зворотний) [13]. Продуктом ПЛР є продукт 149 п. о.

ПЛР проводили за схемою, описаною в літературі [13]: денатурація 3 хв при 94°C, 33 цикли (денатурація 40 с / 94°C, відпал праймерів 40 с / 62°C, синтез 30 с / 72°C), заключний синтез 4 хв при 72°C.

Реакція проводилася у суміші об'ємом 20 мкл (2,5 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10xПЛР-буфера (10X DreamTaqBuffer, «ThermoScientific», USA), 2 мкл 2 мМд НТФ («ThermoScientific», USA), по 0,5 мкл 20 мМ кожного праймера, 0,2 мкл Taq-полімерази (5 од.акт/мкл «ThermoScientific», USA), 12,5 мкл дистильованої води).

ПЛР продукти візуалізували в 3 % агарозному гелі.

Для визначення поліморфізму 399 кодона гена *XRCC1* проводили рестрикцію продуктів

ПЛР за допомогою рестриктази *MspI*. Рестрикцію проводили за схемою, описаною в літературі [13], протягом 5 хв при температурі 37°C у суміші об'ємом 15 мкл (0,5 мкл рестриктази *MspI* (10 од. акт/мкл «ThermoScientific», USA), 1 мкл буфера для рестрикції (10X FastDigestbuffer «ThermoScientific», USA), 5 мкл продукту ПЛР, 8,5 мкл дистильованої води).

Для генотипів 399 кодона гена *XRCC1* були характерні такі продукти рестрикції: 115 та 34 п. о. для Arg/Arg; 149, 115 та 34 п. о. для Arg/Gln; 149 п. о. для Gln/Gln.

Гель-електрофорез продуктів рестрикції проводили у 8 % поліакриламідному гелі.

Відмінності між частотами алелів у різних групах розраховували з використанням критерію Фішера для якісних ознак [26]. Відповідність розподілів генотипів оцінювали за рівнянням Харді–Вайнберга (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>).

Результати та обговорення

Генотип Arg/Arg ідентифіковано у 63 хворих (56,8 %), генотип Arg/Gln – у 31 особи (27,9 %), тоді як генотип Gln/Gln – у 17 осіб (15,3 %) (табл. 1). Частота алелів *Arg* та *Gln* складає $70,7 \pm 4\%$ та $29,3 \pm 4\%$ відповідно. Отримані частоти генотипів у групі хворих РСМ ($\chi^2=11,8$, $p=0,0006$) не відповідають очікуваним рівноважним у відповідності до рівняння Харді–Вайнберга. У контрольній групі спостерігався такий розподіл: генотип Arg/Arg встановлений для 44 осіб (48 %), генотип Arg/Gln – для 38 осіб (41,3 %), генотип Gln/Gln – для 10 осіб (10,7 %). Частота алелів становить $68,5 \pm 4\%$ для *Arg* та $31,5 \pm 4\%$ для *Gln*. Розподіл генотипів у контрольній групі відповідає рівновазі Харді–Вайнберга ($\chi^2=0,172$, $p=0,678$).

Аналіз частот генотипів свідчить про відмінності у поширенні генотипу Arg/Gln, частота якого менша у групі хворих у порівнянні з контролем ($F = 4,32$, $p < 0,05$). Проте ми не виявили асоціацію генотипу Arg/Gln із зниженим ризиком розвитку раку сечового міхура в популяції України ($OR = 0,55$, 95 % $CI = 0,31$ to $0,99$, $p = 0,13$).

Хворі РСМ були поділені на групи, для кожної з яких було визначено частоти генотипів. Клінічні та гістопатологічні характеристики обстежуваної групи хворих у залежності від генотипу 399 кодона гена *XRCC1* наведено в таблиці 2.

Таблиця 1. Частоти генотипів та алелів 399 кодона гена *XRCC1*

Хворі РСМ		Контроль	
Загальна кількість випадків		111	92
Генотипи	Arg/Arg	63 (56,6 %)	44 (48 %)
	Arg/Gln	31 (27,9 %)	38 (41,3 %)
	Gln/Gln	17 (15,3 %)	10 (10,7 %)
Частота алелів, %	Arg	70,7	68,5
	Gln	29,3	31,5
<i>p</i> *	Arg/Arg	>0,05	
	Arg/Gln	<0,05	
	Gln/Gln	>0,05	

Примітка:* – При порівнянні хворих із контролем.

Таблиця 2. Клінічні та гістопатологічні характеристики

Характеристики		Генотипи			Загалом
		Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
Кількість		63	31	17	111
Стать	Чоловіки	59	27	15	101
	Жінки	4	4	2	10
Вік	До 29	0	1	0	1
	30-39	2	1	0	3
	40-49	3	3	1	7
	50-59	23	10	6	39
	60-69	28	14	8	50
	70+	7	2	2	11
Тип РСМ	Інвазивний	51	26	15	92
	Неінвазивний	12	5	2	19
Ступінь злоякісності пухлини	G1	5	2	2	9
	G2	44	22	7	73
	G3	14	7	8	29
Ступінь поширення пухлини (за системою TNM)	T1	12	6	3	21
	T2	35	12	9	56
	T3	11	8	1	20
	T4	5	5	4	14
Тютюнопаління	Так	30	13	5	48
	Ні	33	18	12	63
Шкідливі умови праці	Так	11	9	2	22
	Ні	52	22	15	89
Випадки онкологічних захворювань у сім'ї	Так	11	3	4	18
	Ні	52	28	13	93

При порівнянні частот генотипів 399 кодона не було виявлено різницю в групах, сформованих залежно від статі ($p = 0,57$), віку ($p = 0,45$), типу РСМ ($p = 0,88$), ступеня злоякісності пухлини ($p = 0,26$), ступеня поширення пухлини ($p = 0,14$), впливу шкідливих умов ($p = 0,34$), та випадками онкологічних захворювань у сім'ї ($p = 0,40$). У зв'язку із важливою

роллю тютюнопаління в етіології раку сечового міхура ми проаналізували також частоти генотипів серед курців та некурців хворих РСМ. Значимої різниці не було виявлено ($p = 0,41$).

Встановлено, що генотип Gln/Gln 399 кодона гена *XRCC1* асоційований із ризиком раку легень та раку молочної залози [11], раку простати [27], носоглотки [28], стравоходу [12]. Ці

результати є свідченням ролі поліморфізму 399 кодона у патогенезі різних типів раку [19]. І хоча однозначної асоціації *XRCC1* Arg399Gln поліморфізму з раком сечового міхура не виявлено [21], той факт, що *XRCC1* відіграє ключову роль в ексцизійній репарації основ, а поліморфізм 399 впливає на здатність білка виконувати свою функцію, дозволяє припустити, що Arg399Gln поліморфізм може модифікувати

індивідуальний ризик розвитку раку сечового міхура.

Висновки

Нами вперше проаналізована можливість асоціації поліморфізму Arg399Gln гена *XRCC1* з раком сечового міхура в Україні. Зв'язку між поліморфізмом 399 кодона гена *XRCC1* та ризиком розвитку уротеліальної карциноми виявлено не було.

Література

1. Knowles M.A., Hurst C.D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity // *Nat. Rev. Cancer.* – 2015. – V. 15. – P. 25–41.
2. Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs // IARC Press. – 2004. – P. 90.
3. Wang M., Wang X.-J., Ma Y.-F., Dai Z.-M. PSCA rs2294008 C > T polymorphism contributes to gastric and bladder cancer risk // *Ther. Clin. Risk Manag.* – 2015. – V. 13. – P. 237–245.
4. Dudek A.M., Grotenhuis A.J., Vermeulen S.H., Kiemeny L.A., Verhaegh G.W. Urinary bladder cancer susceptibility markers. What do we know about functional mechanisms? // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 12346–12366.
5. Pashos C.L., Botteman M.F., Laskin B.L., Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management // *Cancer practice.* – 2002. – V. 10. – P. 311–322.
6. Stern M.C., Umbach D.M., vanGils C.H., Lunn R.M., Taylor J.A. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking and bladder cancer risk // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* – 2001. – V. 10. – P. 125–131.
7. Caldecott K.W., McKeown C.K., Tucker J.D., Ljungquist S., Thompson L.H. An interaction between the mammalian DNA repair protein *XRCC1* and DNA ligase III // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – V. 14. – P. 68–76.
8. Mao Y., Xu X., Lin Y. Quantitative assessment of the associations between *XRCC1* polymorphisms and bladder cancer risk // *World. J. Surg. Oncol.* – 2013. – V. 11. – P. 58.
9. Wang M., Qin C., Zhu J., Yuan L., Fu G., Zhang Z., Yin C. Genetic variants of *XRCC1*, *APE1* and *ADPRT* genes and risk of bladder cancer // *DNA and Cell Biology.* – 2010. – V. 29. – P. 303–311.
10. Ramaniuk V.P., Nikitchenko N.V., Savina N.V., Kuzhir T.D., Rolevich A.I., Krasny S.A., Sushinsky V.E., Goncharova R.I. Polymorphism of DNA repair genes *OGG1*, *XRCC1*, *XPB* and *ERCC1* in bladder cancer in Belarus // *Biomarkers.* – 2014. – V. 19. – P. 509–516.
11. Duell E.J., Wiencke J.K., Cheng T.J. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells // *Carcinogenesis.* – 2000. – V. 21. – P. 965–971.
12. Yin M., Tan D., Wei Q. Genetic variants of the *XRCC1* gene and susceptibility to esophageal cancer: a meta-analysis // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2009. – V. 2. – P. 26–35.
13. Arizono K. DNA Repair Gene *hOGG1* Codon 326 and *XRCC1* Codon 399 Polymorphisms and Bladder Cancer Risk in a Japanese Population // *Jpn. J. Clin. Oncol.* – 2008. – V. 38. – P. 186–191.
14. Fontana L. DNA Repair Gene *ERCC2*, *XPC*, *XRCC1*, *XRCC3* Polymorphisms and Associations with Bladder Cancer Risk in a French Cohort // *Anticancer Research.* – 2008. – V. 28. – P. 1853–1856.
15. Shen M. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB*, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2003. – V. 12. – P. 1234–1240.
16. Kelsey K.T. A population-based case-control study of the *XRCC1* Arg399Gln polymorphism and susceptibility to bladder cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2004. – V. 13. – P. 1337–1341.
17. Matullo G., Guarrera S., Carturan S. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study // *Int. J. Cancer.* – 2001. – V. 4. – P. 562–567.
18. Chiang C.-I., Huang Y.-L., Chen W.-J., Shiue H.-S., Huang C.-Y., Pu Y.-S., Lin Y.-C., Hsueh Y.-M. *XRCC1* Arg194Trp and Arg399Gln polymorphisms and arsenic methylation capacity are associated with urothelial carcinoma // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 2014. – V. 279. – P. 373–379.
19. Zhuo W., Zhang L., Cai L., Zhu B., Chen Z. *XRCC1* Arg399Gln polymorphism and bladder cancer risk: updated meta-analyses based on 5767 cases and 6919 controls // *Exp. Biol. Med.* – 2013. – V. 238. – P. 66–76.
20. Dong L.M., Zhang X.Y., Teng H., Li M.S., Wang P. Meta-analysis demonstrates no association between *XRCC1* Arg399Gln polymorphism and bladder cancer risk // *Genet. Mol. Res.* – 2014. – V. 13. – P. 9976–9985.
21. Liu N., Fei X., Shen Y., Shi W., Ma J. Correlation between *XRCC1* Arg399Gln genetic polymorphisms and susceptibility to bladder cancer: a meta-analysis // *Oncotargets and Therapy.* – 2016. – V. 9. – P. 579–586.
22. Lao T., Gu W., Huang Q. A meta-analysis on *XRCC1* R399Q and R194W polymorphisms, smoking and bladder cancer risk // *Mutagenesis.* – 2008. – V. 23. – P. 523–532.
23. Li S., Peng Q., Chen Y., You J., Chen Z., Deng Y., Lao X., Wu H., Qin X., Zeng Z. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk: a meta-analysis // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8. – P. 1–14.

24. Denisov E.V., Cherdyntseva N.V., Litviakov N.V., Malinovskaya E.A., Babyskina N.N., Belyavskaya V.A., Voevoda M.I. *TP53* gene polymorphism in cancer risk: the modulating effect of ageing, ethnicity and TP53 somatic abnormalities. In: Cheng Y., editor. Tumor suppressor genes [Електронний ресурс]. Rijeka, Croatia: InTech. – 2012. – P. 79–110. – Режим доступу: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/27564.pdf>.
25. Dumont P., Leu J.I., Della Pietra A.C. 3rd, George D.L., Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential // *Nat Genet.* – 2003. – V. 33. – P. 357–365.
26. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
27. Wei B., Zhou Y., Xu Z., Ruan J., Zhu M., Jin K., Zhou D., Hu Q., Wang Q., Wang Z., Yan Z. *XRCC1* Arg399Gln and Arg194Trp polymorphisms in prostate cancer risk: a meta-analysis // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* – 2011. – V. 14. – P. 225–231.
28. Huang G.L., Guo H.Q., Yu C.Y., Liu X.Y., Li B.B., Wu J.J., He Z.W. *XRCC1* polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2011. – V. 12. – P. 2329–2333.

MISHCHUK Ya.M.¹, KHARKIVSKA Ye.V.¹, SERGA S.V.¹, SHKLYAR S.E.¹, KATRII V.B.¹, KOLIADA O.K.², STAKHOVSKIY O.E.³, STAKHOVSKIY E.O.³, VITRUK Yu.V.³, KONONENKO A.A.³, DEMYDOV S.V.¹, OSTAPCHENKO L.I.¹, KOZERETSKA I.A.¹

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine", Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: slavamishchuk@gmail.com

² State Institution "D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS Ukraine", Ukraine, 04114, Kyiv, Vyshhorodska str., 67, e-mail: alex.genetic@gmail.com

³ National Cancer Institute, Ukraine, 03022, Kyiv, Lomonosova str., 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

***XRCC1* CODON 399 POLYMORPHISM (RS25487) IN THE UKRAINIAN POPULATION**

Aim. To estimate the frequency of *XRCC1* codon 399 polymorphic variants in bladder cancer patients and in a control group and define association of this polymorphism with a bladder cancer in Ukrainian patients. **Methods.** We determined the allele frequencies for 111 patients and 92 controls. Genotyping was performed by PCR-RELP method. **Results.** The distribution of genotypes in control group was: Arg/Arg – 48 % (n=44), Arg/Gln – 41.3 % (n=38), Gln/Gln – 10.7 % (n=10), whereas in group of patients with a bladder cancer the following distribution was observed: Arg/Arg – 56.8 % (n=63), Arg/Gln – 27.9 % (n=31), Gln/Gln – 15.3 % (n=17). Genotype distribution in control group was within Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=59.7$, $p<0.0001$), whereas in patient group it was not ($\chi^2=0.172$, $p=0.678$). No significant association was observed between the *XRCC1* Arg399Gln polymorphism and bladder cancer risk. **Conclusions.** It is indicated that *XRCC1* codon 399 polymorphism may not contribute to bladder cancer susceptibility in the Ukrainian population

Keywords: bladder cancer, polymorphism, *XRCC1* gene, the cancer risk.