

Д. Б. Бабенко, Е. А. Колесникова, С. И. Колесниченко, И. А. Кадырова, И. В. Коршуков,
В. Б. Сирота, Л. Л. Ахмалдинова, А. А. Турмухамбетова

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ 12 ХРОМОСОМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ, У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОПУЛЯЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО КАЗАХСТАНА

Медицинский университет Караганды (Караганда, Казахстан)

Колоректальный рак (КРР) является одной из наиболее часто диагностируемых злокачественных опухолей в мире и Республике Казахстан. В настоящее время к этиологии КРР относят изучаемые генетические вариации и факторы риска окружающей среды. Данное исследование проводилось с целью поиска полиморфизмов, связанных с развитием колоректальной аденокарциномы у представителей популяции Центрального Казахстана. Значительное количество полиморфизмов, связанных с колоректальным раком, было локализовано в 12 хромосоме.

Материалы и методы: исследование включало в себя 441 участника. В качестве исследуемого материала использовалась венозная кровь, из которой выделялась ДНК. Далее проводили генотипирование с помощью *QuantStudio 12K Flex PCR*. Статистическая обработка включала в себя такие параметры, как критерий χ^2 Пирсона, определение отношения шансов и 95% доверительные интервалы. Связь «генотип – фенотип» определялась с использованием *general linear model* с вариантами множественного наследования.

Результаты и обсуждение: все полиморфизмы отвечали правилу равновесия Харди – Вайнберга. Четыре значимых полиморфизма в соответствии с тестом χ^2 имели MAF, ассоциированные с риском развития колоректального рака. Для них был проведен анализ моделей наследования на основе лог-аддитивной модели. Полученные данные позволили говорить о повышении риска развития колоректального рака для rs3217810 и уменьшение риска развития для rs 7315438, rs2238126, rs11064437.

Выводы: определены полиморфизмы, которые связаны с риском развития колоректального рака в Казахстанской популяции согласно лог-аддитивной модели наследования и распределению частот минорных аллелей.

Ключевые слова: полиморфизм, SNP, колоректальный рак, генотип, аллель

Колоректальный рак (КРР) ежегодно поражает более 2 млн. пациентов, и более 600 тыс. умирают от этого заболевания [1]. Несмотря на значительные наследственные факторы, большинство случаев КРР носят спорадический характер и незаметно развиваются в течение нескольких лет. В настоящее время к этиологии КРР относят изучаемые генетические вариации и факторы риска окружающей среды [5]. SNP могут варьироваться в зависимости от этнической группы и увеличивать вероятность развития патологии.

Исследование проведено с целью поиска полиморфизмов, связанных с развитием колоректальной аденокарциномы у представителей популяции Центрального Казахстана. Значительное количество полиморфизмов, связанных с колоректальным раком, было локализовано в 12 хромосоме.

Цель работы – определение связи между SNP в 12 хромосоме и риском развития колоректального рака в популяции Центрального Казахстана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 282 пациента с КРР и 159 условно здоровых участников исследования, составивших контрольную

группу. Каждый участник исследования подписал письменное информированное согласие, после чего у них был осуществлен забор 3-5 мл венозной крови. Все участники в рамках национального скрининга прошли через общеклиническое обследование, фиброколоноскопию, также был проведен экспресс-тест кала на скрытую кровь. Клинический диагноз пациентам с КРР устанавливали согласно МКБ-10. Протокол исследования утвержден Комитетом по биоэтике КГМУ №305 от 19 мая 2017 г.

Критерии включения: возраст 18-80 лет, колоректальная аденокарцинома. *Критерии исключения:* наследственная форма КРР, соматические заболевания в стадии декомпенсации, наличие генетических заболеваний.

Для проведения генетических исследований периферическую кровь пациентов забирали в вакуумные пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Геномную ДНК выделяли из цельной крови с использованием коммерческих наборов *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Scientific, Вильнюс, Литва) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию ДНК измеряли с помощью *NanoPhotometer* (Implen, Германия). Выделенную ДНК хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Анализ и отбор SNP осуществляли с помощью *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/>). Было отобрано 9 SNP для панели генотипирования, которые ранее упоминались в публикациях и ассоциировались с риском KPP. Генотипирование проводили с помощью *QuantStudio 12K Flex PCR*. Кривые амплификации анализировали с помощью официального приложения *ThermoFisher* (<https://apps.thermofisher.com>). Генотипы определяли в двумерном пространстве – кластер гомозиготных генотипов по первому аллелю располагался на оси X, а гомозиготные генотипы по второму аллелю на оси Y. Между ними располагался кластер гетерозиготных генотипов.

Статистический анализ проводился с использованием онлайн-ресурса *SNPstats* (<https://www.snpsstats.net/>) и статистики R (V 3.6.3). По результатам генотипирования для каждого полиморфизма в двух группах рассчитывались такие параметры, как процентное соотношение основных и минорных аллелей, значение частоты минорных аллелей (MAF – минорная частота аллелей) и относительные значения для генотипов. Каждое частотное распределение SNP оценивали с использованием правила равновесия Харди – Вайнберга (HWE) в контрольной группе. Сравнение генотипического распределения и частот аллелей между группами проводилось с использованием критерия χ^2 (критерий хи-квадрат Пирсона). Чтобы оценить связь между SNP 12 хромосомы и риска возникновения KPP, проведено определение отношения шансов (ОШ) и 95% доверительных интервалов (ДИ). Различия

между выборками считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Связь «генотип – фенотип» определялась с использованием *general linear model* (GLM) с вариантами множественного наследования (лог-аддитивная модель). Для значения p рассчитывался критерий FDR – поправка на множественность исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование были включены 441 участник, в том числе 282 пациента с KPP (149 мужчин, 133 женщины; средний возраст – $64,97 \pm 10,77$ лет) и 159 условно здоровых участников (83 мужчины, 76 женщин; средний возраст – $46,59 \pm 13,58$) (табл. 1).

В общей сложности у всех участников было успешно генотипировано 9 SNP, все протестированные SNP соответствовали равновесию Харди – Вайнберга (HWE) в контрольной группе. Таким образом, все SNP достигли критического значения $p \geq 0,05$ для HWE в контроле и были включены в дальнейший анализ.

Проанализирован список изученных полиморфизмов, их расположение и положение на хромосоме, возможные функции в генах и достигнутый уровень значимости точного теста на HWE в контрольной группе (табл. 2).

Для представленных ассоциаций «SNP – KPP» был рассчитан критерий χ^2 и ОШ. Поскольку осуществлялось множество сравнений, то было применена поправка FDR для значений p -value.

Обнаружено, что с KPP связаны следующие SNP: rs3217810 (ОШ=2.1380; 95% ДИ: от 1.1932 до 3.8307; $p=0,045$), rs11064437 (ОШ=0.3071; 95% ДИ: от 0.1428 до 0.6604;

Таблица 1 – Общие характеристики участников исследования

Показатель	Исследуемая группа		Контрольная группа	
	абс.	%	абс.	%
Мужчины	149	53%	83	52%
Женщины	133	47%	76	48%
Средний возраст \pm стандартное отклонение	64,97 \pm 10,77		46,59 \pm 13,58	

Таблица 2 – Основная информация о SNP, представленных в этом исследовании

SNP ID	Band	Позиция	Ген	Возможная функция	HWE
rs12309274	12p13.33	866782	WNK1	intronic	0,68
rs4572213	12p13.32	4256383	CCND2-AS1	non-coding intronic	0,38
rs10774214	12p13.32	4259186	CCND2-AS1	non-coding intronic	0,17
rs3217810	12p13.32	4279105	CCND2	non-coding intronic	1
rs10849432	12p13.31	6276561			1
rs11064437	12p13.31	6872998	TPI1/RPL13P5/LRRC23/SPSB2	intronic	1
rs2238126	12p13.2	11856807	ETV6	intronic	0,07
rs7315438	12q24.21	115453598			0,71
rs73208120	12q24.22	117309785	NOS1	intronic	1

Теоретическая и экспериментальная медицина

Таблица 3 – Частота минорных аллелей (MAF), наличие взаимосвязи между SNP и риском КРР ($p \chi^2$)

SNP ID	Аллели	MAF		ОШ	95% ДИ	p (χ^2)	FDR
		контроль	пациенты с КРР				
rs12309274	T/G	0.15	0.16	1.0833	0.6518 – 1.8006	0.758	0.758
rs4572213	A/T	0.24	0.19	0.7303	0.4766 – 1.1193	0.149	0.2682
rs10774214	C/T	0.43	0.38	0.8059	0.5521 – 1.1764	0.264	0.339
rs3217810	C/T	0.07	0.13	2.1380	1.1932 – 3.8307	0.010	0.045*
rs10849432	T/C	0.14	0.18	1.3364	0.6923 – 2.5797	0.387	0.435
rs11064437	C/T	0.07	0.02	0.3071	0.1428 – 0.6604	0.002	0.018*
rs2238126	A/G	0.33	0.22	0.5607	0.3428 – 0.9171	0.021	0.04725*
rs7315438	T/C	0.54	0.45	0.6795	0.5014 – 0.9210	0.013	0.039*
rs73208120	T/G	0.05	0.07	1.5272	0.7864 – 2.9659	0.209	0.3135

Таблица 4 – Лог-аддитивные модели наследования для значимых SNP

SNP	Генотип	ОШ	95% ДИ	p
rs3217810	0,1,2 (CC/CT/TT)	2.17	1.20 – 3.92	0,061
rs7315438	0,1,2 (TT/CT/CC)	0.68	0.50 – 0.93	0,013
rs2238126	0,1,2 (AA/AG/GG)	0.58	0.36 – 0.94	0,028
rs11064437	0,1,2 (CC/CT/TT)	0.29	0.13 – 0.64	0,02

$p=0,018$), rs2238126 (ОШ=0.5607; 95% ДИ: от 0.3428 до 0.9171; $p=0,047$), rs7315438 (ОШ=0.6795, 95% ДИ: от 0.5014 до 0.9210; $p=0,039$) (табл. 3).

Результаты согласуются с данными других исследователей. rs3217810 находится на хромосоме 12p13 в гене циклина D2 (CCND2). Циклины регулируют экспрессию и деградацию циклинзависимых киназ и способствуют кратковременной координации митоза. Согласно литературным источникам, rs3217810 способствовал увеличению риска развития КРР (ОШ 1,20 на аллель риска; $p=5,9 \times 10^{-8}$). Хотя и указывается, что частота минорного аллеля rs3217810 у представителей европейского происхождения составляла в среднем 0,16, и этот SNP очень редко встречается в азиатских популяциях (0,03 у японцев в Токио, Япония и 0,01 у китайцев хань из Пекина, Китай) [3].

Также rs7315438 показал статистически значимую ассоциацию с риском развития КРР в комбинированном метаанализе GWAS. SNP расположен на хромосоме 12q24 выше белка T-box 3 (TXB3). rs7315438 расположен ниже MED13L, который кодирует субъединицу медиаторного комплекса – большого комплекса белков, который функционирует как транскрипционный коактиватор для большинства генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Однако этот SNP также находится во взаимодействии генов, кодирующих регуляторы транскрипции, включая супрессор киназы RAS2

(KSR2). В проведенном исследовании ОШ для rs7315438 указывают на уменьшение риска КРР. Это объясняется тем, что в данном случае минорный аллель не является рискованным аллелем и соответственно приводит к уменьшению риска развития КРР. При рассмотрении аллеля Т в качестве эффективного рискованного аллеля ОШ будет указывать на увеличение риска развития КРР, что согласуется с литературными данными [4].

Аналогичная ситуация складывается для rs2238126 и rs11064437. GWAS указывает на увеличение риска КРР при наличии данных полиморфизмов, объясняя это изменением процесса сплайсинга и формированием транскрипционной изоформы с укороченной не-транслируемой областью в экзоне [2, 6].

Таким образом, определены полиморфизмы, которые связаны с риском развития КРР в Казахстанской популяции согласно лог-аддитивной модели наследования и распределению частот минорных аллелей. Проведенное исследование представляет собой экспериментальную работу, а результаты обладают научной новизной. Однако необходимы дальнейшие исследования аллелей, связанных с риском развития КРР, для предоставления клинически значимой информации.

Информация о финансировании. Работа выполнена в рамках НТП О.0821 «Персонализированный подход в управлении ряда значимых заболеваний», финансируемой МОН РК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1 Brenner H. Colorectal cancer /H. Brenner, M. Kloor, C. P. Pox //Lancet. – 2014. – V. 383. – P. 1490-1502.

2 Common genetic variation in ETV6 is associated with colorectal cancer susceptibility / M. Wang, D. Gu, M. Du et al. //Nat. Commun. – 2016. – V. 7. – P. 11478.

3 Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis /U. Peters, S. Jiao, F. R. Schumacher et al. //Gastroenterology. – 2013. – V. 144 (4). – P. 799-807.

4 Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk /U. Peters, C. M. Hutter, L. Hsu et al. //Hum Genet. – 2012. – V. 131(2). – P. 217-234.

5 Single Nucleotide Polymorphism in SMAD7 and CHI3L1 and Colorectal Cancer Risk / E. F. Abd, A. Amal, N. Sadik et al. //Mediators of Inflammation. – 2018, 9853192

6 Zeng C. Identification of Susceptibility Loci and Genes for Colorectal Cancer Risk /C. Zeng, K. Matsuda, W. H. Jia //Gastroenterology. – 2016. – V. 150 (7). – P. 1633-1645.

Поступила 08.07.2020 г.

D. B. Babenko, Ye. A. Kolesnikova, S. I. Kolesnichenko, I. A. Kadyrova, I. V. Korshukov, V. B. Sirota, L. L. Akhmaltdinova, A. A. Turmukhambetova

*ASSOCIATION OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF THE 12TH CHROMOSOME WITH COLORECTAL CANCER IN REPRESENTATIVES OF THE POPULATION OF CENTRAL KAZAKHSTAN
Karaganda medical university (Karaganda, Kazakhstan)*

Colorectal cancer is one of the most frequently diagnosed malignant tumors in the world and the Republic of Kazakhstan. Currently, the studied genetic variations and environmental risk factors are attributed to the etiology of colorectal cancer. This study was aimed to search for polymorphisms associated with the development of colorectal adenocarcinoma in representatives of the population of Central Kazakhstan. A significant number of polymorphisms associated with colorectal cancer were localized on chromosome 12.

Materials and methods: the study involved 441 participants. The test material was venous blood, from which DNA was isolated. Next, genotyping was performed using a QuantStudio 12K Flex PCR. Statistical processing included the following parameters, Pearson χ^2 test, determination of the odds ratio and 95% confidence intervals. The genotype-phenotype relationship was determined using the general linear model with multiple inheritance options.

Results and discussion: all polymorphisms met the Hardy – Weinberg equilibrium. Four significant polymorphisms according to the χ^2 test had MAF associated with colorectal cancer risk. For them, an analysis of inheritance models was carried out on the basis of a log-additive model. The data obtained allowed us to speak of an increased risk of colorectal cancer for rs3217810 and a decrease in the risk for: rs7315438, rs2238126, rs11064437.

Conclusion: we identified polymorphisms that are associated with the risk of colorectal cancer in the Kazakhstan population according to the log-additive model of inheritance and the distribution of minor allele frequencies. The research is experimental work, and the results are of scientific novelty.

Key words: polymorphism, SNP, colorectal cancer, genotype, allele

Д. Б. Бабенко, Е. А. Колесникова, С. И. Колесниченко, И. А. Кадырова, И. В. Коршуков, В. Б. Сирота, Л. Л. Ахмалтдинова, А. А. Тұрмұхамбетова

*12-ХРОМОСОМАНЫҢ БІР НУКЛЕОТИДТІ ПОЛИМОРФИЗМІ, ОРТАЛЫҚ ҚАЗАҚСТАН ПОПУЛЯЦИЯСЫ ӨКІЛДЕРІНІҢ КОЛОРЕКТАЛЬДЫ ІСІКПЕН БАЙЛАНЫСТЫ
Қарағанды медицина университеті (Қарағанды, Қазақстан Республикасы)*

Колоректальды ісік әлемде және Қазақстан Республикасында жиі диагностикаланатын қатерлі ісіктердің бірі болып табылады. Қазіргі уақытта, колоректальды ісік этиологиясына зерттелетін генетикалық вариациялар мен қоршаған ортаға қауіп факторлары кіреді. Бұл зерттеу Орталық Қазақстан популяциясының өкілдерінде колоректальды аденокарциноманың дамуына байланысты полиморфизмдерді іздеу мақсатында жүргізілді. Колоректальды қатерлі ісікпен байланысты полиморфизмдердің едәуір мөлшері 12 хромосомада локализацияланған.

Материалдар мен әдістер: зерттеуге 441 адам қатысты. Зерттелетін материал ретінде ДНҚ шығарылған веноздық қан қолданылды. Әрі қарай, QuantStudio 12k Flex PCR көмегімен генотиптеу жүргізілді. Статистикалық өңдеуге осындай параметрлер, Пирсон критерийі, мүмкіндік қатынасын анықтау және 95% сенімділік интервалдары кірді. «Генотип – фенотип» байланысы *general linear model* көмегімен бірнеше мұрагерлік нұсқаларымен анықталды.

Нәтижелер және талқылау: барлық полиморфизмдер Харди – Вайнберг тепе-теңдік ережесіне сәйкес келді. χ^2 сынағына сәйкес төрт маңызды полиморфизм колоректальды ісік тәуекелімен байланысты MAF болды.

Теоретическая и экспериментальная медицина

Олар үшін мұрагерлік модельдерге лог-аддитивті модель негізінде талдау жасалды. Алынған мәліметтер rs3217810 үшін, колоректальды ісік тәуекелінің жоғарылауы және RS 7315438, rs2238126, rs11064437 үшін тәуекелдің төмендеуі туралы айтуға мүмкіндік берді.

Қорытынды: Қазақстан популяциясындағы колоректальды ісік тәуекелімен байланысты полиморфизмдер мұрагерліктің лог-аддитивті моделіне және минорлық аллельдердің жиіліктерін бөлуге сәйкес анықталды. Зерттеу-бұл эксперименттік жұмыс, ал нәтижелері ғылыми жаңалыққа ие.

Кілт сөздер: полиморфизм, SNP, колоректальный рак, генотип, аллель