

УДК 616.15;615.38

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

*Н.І. Білоус, І.В. Абраменко, А.А. Чумак,  
І.С.Дягіль, З.В.Мартіна***ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМА RS1042522 ГЕНА P53 НА  
РИЗИК РОЗВИТКУ ПРОГНОСТИЧНО НЕСПРИЯТЛИВИХ  
МУТАЦІЙ ГЕНА P53 У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ  
ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ****Державна установа „Національний науковий  
центр радіаційної медицини НАМН України”**

**Вступ.** Система p53-опосередкованого апоптозу є важливою ланкою патогенезу хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ), а інактивація гена p53 асоційована з агресивними формами захворювання. Поліморфізм у кодоні 72 гена p53 (rs1042522), який призводить до заміни однієї амінокислоти у складі молекули, змінює функціональну активність білка.

**Мета.** Дослідити вплив поліморфізму rs1042522 на появу мутацій p53 у хворих на ХЛЛ. **Методи.** Обстежено 242 хворих на ХЛЛ, визначення поліморфізму rs1042522 і мутацій p53 проведено методом полімеразної ланцюгової реакції та секвенуванням.

**Результати.** Асоціацій клінічних даних на момент постановки діагнозу з поліморфізмом rs1042522 не виявлено, однак у носіїв генотипу Pro/Pro був підвищений ризик появи мутацій p53 після терапії (OR = 17,75; 95% CI 3,9 – 30,74; p=0,001).

**Висновок.** Визначення поліморфізму у кодоні 72 гена p53 може бути використано в якості фактора ризику розвитку мутацій p53 у хворих на ХЛЛ.

**Ключові слова:** хронічна лімфоцитарна лейкемія, мутації p53, поліморфізм rs1042522.

**ВСТУП**

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ), одне з найбільш поширених онкогематологічних захворювань дорослого населення України, характеризується значною варіабельністю перебігу. Однією з найбільш несприятливих прогностичних ознак, що визначає тривалість життя хворих та відповідь на лікування, є мутації гена p53 [1]. Останнім часом з'явилися дані, що на їх появу впливають генетичні чинники, зокрема наявність поліморфізму одного нуклеотиду rs1042522 (single nucleotide polymorphism, SNP) у складі РР домену гена p53, кодон 72 нуклеотидна заміна C/G), яка призводить до наявності у складі молекули або залишку проліну (p53Pro; генотип CCC), або аргініну (p53Arg, генотип CGC). Встановлено, що носії алелі G (p53Arg) мають більшу чутливість до дії про-апоптотичних стимулів, тоді як носійство генотипу Pro/Pro сприяє експресії переважно генів зупинки клітинного циклу [2]. Grossmann et al. показали, що у хворих на ХЛЛ з генотипом Pro/Pro мутації гена

p53 зустрічаються частіше порівняно з носіями генотипів Arg/Arg і Arg/Pro [3]. Аналогічні дані отримали Dong et al. [4]. В той же час деякі дослідники не виявили особливостей перебігу ХЛЛ залежно від поліморфізму rs1042522 [5,6]. У хворих на інші форми злоякісних новоутворень, наприклад, раку легень, частота мутацій p53 у носіїв генотипу Pro/Pro була меншою порівняно з носіями інших генотипів [7]. Зважаючи на протилежність існуючих даних, метою дослідження було дослідження впливу поліморфізма rs1042522 на появу мутацій p53 у хворих на ХЛЛ.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

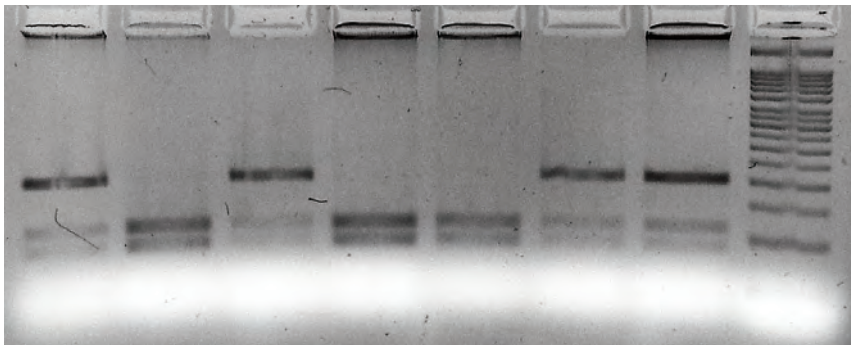
Дослідження поліморфізма rs1042522 і мутацій гена p53 проведено у 242 хворих на ХЛЛ В-клітинного походження: 184 чоловіків (76%) і 58 жінок (24%) у віці від 29 до 86 років на момент діагнозу (середній вік 57,11 ± 0,61 роки, медіана 58 років). Діагноз ХЛЛ встановлювали на основі клініко-гематологічних критеріїв та імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові – виявлення типового фенотипу CD5+CD20+CD23+HLA-DR+CD22low. Стадію захворювання визначали за класифікаціями Rai і Binet. За класифікацією Binet 123 хворих (50,8%) знаходились на ранній стадії захворювання А, 90 хворих (37,2%) – на стадії В (розгорнута) та 29 хворих (12%) – на стадії С. За класифікацією Rai розподіл хворих по стадіям ХЛЛ був наступним: стадія 0 – 30 хворих (12,4%), стадія I – 90 хворих (37,2%), стадія II – 89 хворих (36,8%), стадія III – 22 хворих (9,1%) та стадія IV – 11 хворих (4,5%).

Для проведення генетичних досліджень венозну кров збирали у пробірки з антикоагулянтом. ДНК отримували за допомогою наборів QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Велика Британія) згідно інструкцій виробника.

Визначення поліморфізма rs1042522 гена p53 проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступною рестрикцією отриманих продуктів реакції за Trbusek et al. [1]. Використовували наступні праймери:прямий: 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'; зворотній: 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC -3'.

ПЛР проводили в наступному режимі: ініціація: - 94°C, 7 хв., потім 35 циклів ампліфікації (94°C – 30 сек., 57°C – 45 сек., 72°C – 45 сек.), фінальна елонгація 72°C – 10 хв. Склад суміші для ампліфікації (загальний об'єм 20 мкл): зразок ДНК – 3 мкл, праймери – 0,5 мкл, суміш для ампліфікації Master Mix („Біолабтех”, Україна) – 10 мкл, доза деіонізована – 6 мкл.

При ампліфікації утворюється продукт у 199 пар нуклеотидів (п.н.), який у випадку алелі G (p53Arg) має сайт рестрикції рестриктази BstUI, у випадку алелі С (p53Pro) сайт рестрикції відсутній. Продукт ПЛР інкубували з 10 од. рестриктази BstUI протягом 12 год. при температурі 37°C. Потім проводили електрофорез у 3% агарозному гелі. За носійства генотипу Arg/Arg утворювались 2 смуги розрізаного продукту ПЛР реакції 113 та 86 п.н. За наявності С нуклеотиду у 2 алелях (генотип Pro/Pro) спостерігалась одна смуга нерозрізаного продукту ампліфікації 199 п.н. Гетерозиготний варіант (генотип Arg/Pro) проявлявся присутністю трьох смуг – 199, 113 та 86 п.н. (рис. 1).



**Рис. 1. Результати визначення поліморфізму rs1042522 гена p53 методом полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією отриманих продуктів рестриктазою BstUI**

Мутації p53 (екзони 3-10) визначали методом прямого ДНК секвенування на автоматичному секвенаторі ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Валідизація отриманих результатів проводилась за допомогою міжнародної бази даних IARC TP53 Mutation Database.

Статистичну обробку отриманих даних проводили у програмі SPSS 13.0 software package (SPSS, США). Критичним значенням вірогідності розцінювали  $p < 0,05$ .

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Розподіл генотипів rs1042522 гена p53 в групі хворих на ХЛЛ підпорядковувався рівнянню Харді-Вайнберга ( $\chi^2=1,29$ ) і становив: Arg/Arg – 114 пацієнтів (47,1%); Arg/Pro – 101 пацієнт (41,7%) та Pro/Pro – 27 хворих (11,2%). Отримані дані співпадали з результатами обстеження груп кавказоїдів без онкогематологічної патології (Arg/Arg – 40,6-61,7%; Arg/Pro – 30-53%; Pro/Pro – 6-8%; [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)) і суттєво не відрізнялись від розподілу в група хворих на ХЛЛ, представлених Sturm et al. (Arg/Arg – 57,3%; Arg/Pro – 36,1%; Pro/Pro – 6,6%) [6].

Суттєвих розбіжностей у клініко-гематологічних даних пацієнтів на момент постановки діагнозу залежно від поліморфізму rs1042522 гена p53 не виявлено (табл. 1).

Медіана періоду спостереження за пацієнтами становила 53 міс. Протягом цього терміну 87 пацієнтів отримали хіміотерапевтичне лікування.

Таблиця 1

Клініко-гематологічні дані у хворих на ХПЛ, зафіксовані при постановці діагнозу залежно від генотипів rs1042522 гена p53, кількість хворих (%)

Показники	p53 генотип			P
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
стадія за Binet: A, n=123	60 (48,8)	52 (42,3)	11 (8,9)	0,817
B, n=90	41 (36,0)	36 (40,4)	13 (14,6)	
C, n=29	13 (44,8)	13 (44,8)	3 (10,3)	
стадія за Rai: 0, n=30	13 (43,3)	12 (40,0)	5 (16,7)	0,907
I, n=90	45 (50,0)	38 (42,2)	7 (7,8)	
II, n=89	43 (48,6)	36 (40,9)	10 (11,4)	
III, n=22	6 (36,4)	11 (50,0)	3 (13,6)	
IV, n=11	5 (45,5)	4 (36,4)	2 (18,2)	0,970
лейкоцитоз: >100 Г/л, n=30	14 (46,7)	13 (43,3)	3 (10,0)	
<100 Г/л, n=240	98 (46,7)	88 (41,9)	24 (11,4)	0,984
лейкоцитоз: >70 Г/л, n=44	20 (45,5)	19 (43,2)	5 (11,4)	
<70 Г/л, n=196	92 (46,9)	82 (41,8)	22 (11,2)	0,685
лейкоцитоз, Г/л, M±m	47,63 ± 5,64	46,40 ± 5,91	50,05 ± 13,62	
гіперпластичний синдром $\epsilon$ : n=18	10 (55,6)	6 (33,3)	2 (11,1)	0,710
немає, n=222	102 (45,9)	95 (42,8)	25 (11,3)	
симптоми інтоксикації: $\epsilon$ : n=27	12 (44,4)	10 (37,0)	5 (18,5)	0,439
немає, n=213	100 (46,9)	91 (42,7)	22 (10,3)	
середній вік, роки	57,35 ± 0,83	58,99 ± 0,96	58,15 ± 1,82	0,215

Мутації гена p53 були виявлені у 16 випадках (6,6%), достовірно частіше серед лікованих хворих (10 випадків, 11,5%), ніж серед обстежених на момент діагнозу, до початку лікування (у 6 з 155 нелікованих хворих, 3,9%,  $p=0,022$ ). 10 пацієнтів в якості терапії першої лінії отримували пуринові аналоги, 77 – алкілюючі препарати. Частота мутацій p53 була вдвічі вищою в першій підгрупі, однак розбіжності не досягли статистичної значущості (20% проти 9,1%, відповідно,  $p=0,287$ ). Залежно від генотипів за поліморфізмом rs1042522, частота мутацій гена p53 була значно вищою серед носіїв генотипу Pro/Pro за умов проведеного лікування, тоді як серед нелікованих хворих достовірно не розрізнялась (табл. 2). Ризик розвитку мутацій p53 був підвищений (співвідношення шансів 17,75; 95% довірчий інтервал 3,9 – 30,74;  $p=0,001$ ) порівняно з носіями інших генотипів.

Таблиця 2

Частота мутацій гена p53 серед хворих на ХЛЛ залежно від генотипів rs1042522 та отриманого лікування, кількість хворих (%)

Наявність мутацій гена p53	p53 генотип			P
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
Хворі, обстежені до початку лікування				
є мутації, n=6	4(66,7)	2 (33,3)	0	0,592
мутацій немає, n=149	73 (49,0)	61 (40,9)	15 (10,1)	
Хворі, обстежені після проведеного лікування				
є мутації, n=10	1 (10,0)	3 (30,0)	6 (60,0)	0,001
мутацій немає, n=77	36 (46,8)	35 (45,4)	6 (7,8)	

Таким чином, отримані результати співпадають з даними літератури і свідчать про доцільність визначення поліморфізму rs1042522 як фактора ризику розвитку мутацій гена p53 у хворих на ХЛЛ після терапії. На наш погляд, підвищений ризик розвитку мутацій p53 у носіїв генотипу Pro/Pro пов'язаний з тим, що в таких осіб в клітинах у відповідь на дію генотоксичних стимулів (в даному випадку – хіміотерапевтичні агенти, які призводять до пошкодження ДНК) експресуються переважно гени зупинки клітинного циклу, а не гени індукції апоптозу [2]. Це може ускладнювати елімінацію клітин з нерепарованими подшодженнями і їх накопиченням.

### ВИСНОВКИ

1. Розподіл генотипів за поліморфізмом rs1042522 у хворих на ХЛЛ співпадає з розподілом в групах кавказоїдів без онкогематологічної патології та не асоційований з клінічними ознаками на момент діагностики захворювання.

2. Частота мутацій гена p53 серед хворих на ХЛЛ, обстежених на момент діагнозу захворювання, не розрізнялась у носіїв окремих генотипів rs1042522.

3. Хворі на ХЛЛ, носії генотипу Pro/Pro, мали підвищений ризик розвитку мутацій гена p53 на тлі проведеного хіміотерапевтичного лікування.

Перспективність подальшого дослідження пов'язана з розробкою нових підходів до лікування хворих з генотипом Pro/Pro, з метою зниження ризику появи мутацій p53.

### Література

1. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia / Trbusek M., Smardova J., Malcikove J. [et al.] // J. Clin. Oncol.- 2011.- Vol. 29, N19. – P. 2703-2708.

2. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo / Sullivan A., Syed N., Gasco M. [et al.] // Oncogene. - 2009.- Vol. 26.- P. :3328–3337.

3. The TP53 codon72 polymorphism is associated with TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia / Grossmann V., Artusi V., Schnittger S. [et al.] // ASH-2011. Oral and Poster Abstracts Session: 641. – 2011. – P. 1178.

4. TP53 Pro72 allele potentially increases the poor prognostic significance of TP53 mutation in chronic lymphocytic leukemia / Dong H.J., Fang C., Wang L. [et al.] // Med. Oncol. - 2014. – Vol.31, N4. – P. :908 – 911..

5. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia / Kochethu G., Delgado J., Pepper C. [et al.] // Leuk. Res. – 2006. – Vol.30, N9. – P. 1113-1118.

6. In B-CLL, the codon 72 polymorphic variants of p53 are not related to drug resistance and disease prognosis / Sturm I., Bosanquet A.G., Hummel M. [et al.] // BMC Cancer. – 2005. – Vol.5, N1. – 105-109...

7. Frequency of TP53 mutations in relation to Arg72Pro genotypes in non small cell lung cancer / Lind H., Ekstrom P.O., Ryberg D. [et al.] // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010. – Vol. 16.- P. 2077-2081.

**Н.И Билоус, И.В. Абраменко, А.А. Чумак, И.С.Дягиль, З.В.Мартина**  
**Влияние полиморфизма RS1042522 гена P53 на риск развития прогностично неблагоприятных мутаций гена p53 у больных хроническим лимфолейкозом**

**ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины»**

**Введение.** Система p53-опосредованного апоптоза является важным звеном патогенеза хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), а инактивация гена p53 ассоциирована с агрессивными формами заболевания. Полиморфизм в области 72 кодона гена p53 (rs1042522), который приводит к замене одной аминокислоты в составе молекулы, меняет и функциональную активность белка.

**Цель.** Исследовать влияние полиморфизма rs1042522 на появление мутаций p53 у больных ХЛЛ.

**Методы.** Обследовано 242 больных ХЛЛ, определение полиморфизма rs1042522 и мутаций p53 проведено методом полимеразной цепной реакции и сиквенсом.

**Результаты.** Ассоциаций клинических данных на момент постановки диагноза с полиморфизмом rs1042522 не выявлено, однако у носителей генотипа Pro/Pro был повышен риск развития мутаций гена p53 после проведения терапии (OR = 17,75; 95% CI 3,9 – 30,74; p=0,001).

**Вывод.** Определение полиморфизма в кодоне 72 гена p53 можно использовать как фактор риска развития мутаций p53 у больных ХЛЛ.

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз, мутации p53, полиморфизм rs1042522.

**N. S. Bilous, I. V. Abramenko, A. A. Chumak, I. S. Diagil, Z. V. Martina**  
**Influence of RS1042522 polymorphism on risk of unfavorable P53 mutations incidence in patients with chronic lymphocytic leukemia**  
**SI “National Scientific Centre for Radiation Medicine of NAMS of Ukraine”**

**Introduction.** Defects in the tumour suppressor gene p53 pathway are known to be important in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and p53 inactivation is associated with a particularly aggressive form of CLL. A single nucleotide polymorphism in codon 72 of p53 (rs1042522) leads to a single amino acid change that causes a change in apoptotic potential.

**Aim of the study** was to evaluate the influence of rs1042522 polymorphism on incidence of p53 mutations in patients with CLL.

**Methods.** 242 CLL samples were analyzed by PCR and sequencing for single nucleotide polymorphism and p53 mutations.

**Results.** There was found no associations between rs 1042522 polymorphism and clinical data of patients at diagnosis, but the Pro/Pro genotype was associated with an increased incidence of p53 mutations after the treatment (OR = 17.75; 95% CI 3.9 – 30.74; p=0.001).

**Conclusion.** The study revealed that p53 codon 72 polymorphism may be used as risk factor for incidence of p53 mutations in CLL.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, p53 mutations, rs1042522 polymorphism.

#### **Відомості про авторів:**

1. Білоус Надія Іванівна – к.б.н., с. н. с. лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології Інституту клінічної радіології (ІКР) ННЦРМ. Адреса: Київ, вул. Мельникова, 53.

2. Абраменко Ірина Вікторівна – д.м.н., гол. н.с. лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології ІКР ННЦРМ. Адреса: Київ, вул. Мельникова, 53.

3. Чумак Анатолій Андрійович - д.м.н., проф., завідувач лабораторії молекулярної біології відділу клінічної імунології ІКР ННЦРМ. Адреса: Київ, вул. Мельникова, 53.

4. Дягіль Ірина Сергіївна - д.м.н., завідувач відділення радіаційної онкогематології та трансплантації стовбурових клітин кісткового мозку ІКР ННЦРМ. Адреса: Київ, вул. Мельникова, 53.

5. Мартіна Зоя Володимирівна - к.м.н., завідувач відділенні гематології клініки ННЦРМ. Адреса: Київ, вул. Мельникова, 53.

**УДК 616.15;615.38**

**© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014**

***Н.В.Горяїнова, А.І.Гордієнко, Н.М.Третьак,  
В.О.Кубарова***

**РОЛЬ БІЛКА c-KIT (CD 117) У РОЗВИТКУ ГОСТРОЇ  
МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ ТА СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО  
ЙОГО ІНГІБУВАННЯ**

**ДУ «Інститут гематології та трансфузіології  
НАМН України»**

**Вступ.** Ген c-KIT (CD117) кодує рецепторну тирозинкіназу, яка грає ключову роль у виживанні, проліферації та диференціюванні кровотворних клітин-попередників, а значить – у механізмі розвитку лейкемії. Висока експресія c-KIT є частою знахідкою і потенційною терапевтичною цілью при ГМЛ.

**Мета.** Виявити частоту наявності експресії c-KIT (CD117) на бластних клітинах хворих на ГМЛ при різних ФАБ-варіантах та встановити взаємозв'язок між експресією цього маркера, CD34 та клініко-гематологічними особливостями перебігу захворювання.