

Значение конституциональных полиморфизмов гена *p53* у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами

Пospelova T.I., Voyevoda M.I., Voropaeva E.N., Belyavskaya V.A.,
Kovynev I.B., Berezina O.V.

Value of constitutional polymorphisms gene *p53* at patients with non-Hodgkin's lymphomas

Pospelova T.I., Voyevoda M.I., Voropaeva Ye.N., Belyavskaya V.A.,
Kovynev I.B., Berezina O.V.

Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск
Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, г. Новосибирск
НПО «Вектор», г. Новосибирск

© Пospelova T.I., Voyevoda M.I., Voropaeva E.N. и др.

Введение

Неходжкинские злокачественные лимфомы (НХЗЛ) — это гетерогенная группа злокачественных лимфопролиферативных опухолей, различающихся по биологическим свойствам, морфологическому строению, клиническим проявлениям, ответу на терапию и прогнозу. В России они составляют 2,6% всех злокачественных новообразований [1, 2]. Несмотря на улучшение результатов лечения, связанного с применением высокодозной программной полихимиотерапии, смертность от лимфом продолжает увеличиваться на 2% в год. Это определяет необходимость дальнейшего изучения механизмов злокачественной трансформации лимфоидных клеток и опухолевой прогрессии [1, 2].

В настоящее время не вызывает сомнений, что процесс онкогенеза заключается в патологических изменениях вначале на молекулярном, а затем на клеточном уровне, а предрасположенность к злокачественным новообразованиям и опухолевая прогрессия могут модифицироваться не только соматическими мутациями, но и аллельными полиморфизмами генов [3, 4]. За последние годы идентифицированы десятки полиморфных генов-кандидатов, которые могут при-

нимать участие в формировании онкологического риска.

Ген *p53* — это опухолевый супрессор, локализованный на хромосоме 17, который имеет множество важных биологических функций. К ним относятся регуляция клеточного цикла, контроль репарации ДНК, а также запуск апоптоза в поврежденных клетках [1]. Анализ его структуры в опухолях человека необыкновенно важен, поскольку изменения в гене *p53* не только способствуют неопластическому росту, но и могут быть связаны с короткой выживаемостью или плохим ответом пациентов на лечение [5]. В 1989 г., после первого описания мутации данного антионкогена в клетках опухоли ободочной кишки и линиях клеток рака легкого, Nigro и соавт. исследовали статус гена *p53* нескольких типов опухолей и показали, что его мутации — частое явление в онкогенезе у людей [6].

Известно, что от 50 до 80% солидных опухолей содержат мутации гена *p53*. Исследования, проведенные ранее, показали, что мутантный *p53* определяется в 16% фолликулярных лимфом [7] и в 13% первичных в-крупноклеточных лимфом средостения [8]. По данным Gaidano и соавт., мутации *p53* были выявлены в опухолевой ткани MALT-лимфом высокой степени градации [9].

В этих условиях именно врожденные полиморфизмы гена *p53*, приводящие к нарушению функционирования соответствующего белка, могут обуславливать предрасположенность их носителей к развитию НХЗЛ.

В настоящее время в гене *p53* идентифицировано более 13 олигонуклеотидных полиморфизмов. Некоторые из них были проанализированы на больших выборках населения, и их распределение в человеческой популяции известно. Достаточно широко изучена роль полиморфных локусов *dup16bp* (дупликация 16 пар нуклеотидов) 3-го интрона, *Arg72Pro* (замена аргинина на глицин в 72-м кодоне) 4-го экзона и *G→C* (замена гуанина на цитозин в 61-м кодоне) 6-го интрона гена *p53* при солидных новообразованиях.

Arg72Pro 4-го экзона гена *p53* характеризуется заменой в 72-м кодоне 4-го экзона цитозина на глицин. Это ведет к трансляции двух функционально и биохимически различных вариантов белка *p53*: с аргинином или пролином в 72-м кодоне области, богатой пролиновыми остатками, которая вовлечена в апоптотическую деятельность *p53*. В ряде исследований было показано, что форма *72Arg p53* значительно более эффективно, чем форма *72Pro*, запускает запрограммированную клеточную смерть [10, 11]. Данные Dumont и соавт. указывают, по крайней мере, на один механизм усиления апоптогенного потенциала. Это большая способностью *72Arg*-формы проникать в митохондрии, что сопровождается высвобождением в цитоплазму цитохрома С [11]. В отличие от него вариант *72Pro* способен индуцировать более высокий уровень задержки клеток в G1-фазе клеточного цикла и обеспечивать репарацию ДНК [12]. Таким образом, *Arg72Pro* 4-го экзона гена *p53* может быть ассоциирован с увеличением риска возникновения опухолевых образований.

Дупликация *dup16bp* 3-го интрона (5'-gacctggaggctggg-3') (нуклеотиды 11951—11966) гена *p53* впервые была описана в 1993 г. Lazar и соавт. [13], а замена *G→C* (нуклеотид 13494) в 6-м интроне гена *p53* — в 1995 г. Peller и соавт. [14]. Известно, что полиморфизмы в интронных элементах могут быть важны в регулировании экспрессии ге-

нов. Идентификация этих уникальных мутаций, которые приводят к абберантной экспрессии гена *p53*, может помочь в идентификации лиц, имеющих риск развития неоплазий [14, 15].

В настоящее время значение полиморфизмов гена *p53* как в эпидемиологии, так и патофизиологии опухолей остается до конца не ясным. В течение двух последних десятилетий проводилось большое количество исследований с целью изучения ассоциации между *Arg72Pro ex4*, *dup16bp in3* и *G/C in6* гена *p53* и риском солидных новообразований у людей [16—26]. В различных исследованиях одни и те же аллели имели как защитный, так и проонкогенный эффект в зависимости от этнической принадлежности населения [16], локализации и гистологического типа опухоли, конкурирующих генетических событий [22—24, 27], а также воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды [17, 18]. По этой причине данные литературы по вопросу о роли полиморфных вариантов ДНК в онкологическом риске и опухолевой прогрессии часто являются противоречивыми, а результаты отдельных работ обладают плохой воспроизводимостью. Все это создает невозможность механического переноса результатов, полученных зарубежными авторами на солидных опухолях, на опухоли крови.

Вместе с тем генетически обусловленная вариабельность таких процессов, как пролиферативная активность лимфоцитов, репарация повреждений ДНК, пути запуска апоптоза в клетках, защита от химических канцерогенов, ионизирующего излучения и других негативных факторов, может быть чрезвычайно важна в лимфомогенезе. Роль же врожденных полиморфизмов гена *p53* в патогенезе НХЗЛ не известна.

Цель данного исследования — изучение частоты *Arg72Pro ex4*, *dup16bp in3* и *G/C in6* гена *p53* у пациентов с неходжкинскими злокачественными лимфомами и установление их связи с риском развития и особенностями клинического течения НХЗЛ.

Материал и методы

Группу обследованных составили 99 пациентов с впервые установленным диагнозом неходжкинской злокачественной лимфомы, из них мужчин — 44, женщин — 55. Средний возраст больных ($52,2 \pm 15,5$) года. Согласно классификации ВОЗ (2001) агрессивные лимфомы (высокой степени злокачественности), к которым относились диффузная крупноклеточная, centroбластная, иммунобластная, плазмобластная, анапластическая, фолликулярная 3-го цитологического типа и мантийноклеточная, были диагностированы у 43 (43,4%) пациентов, а индолентные (низкой степени злокачественности), к которым относились диффузная мелкоклеточная, пролимфоцитарная, centroцитарная, лимфоплазмочитарная, фолликулярная 1-го цитологического типа, грибовидный микоз, маргинально-клеточная, MALT-лимфома, у 56 (56,6%) человек. Все пациенты были обследованы в момент диагностики заболевания до начала активной полихимиотерапии для исключения ее влияния на результаты исследования.

Контролем служили данные о частоте полиморфизмов dup16bp 3-го интрона, Arg72Pro 4-го экзона и G→C 6-го интрона гена *p53* среди практически здоровых лиц — жителей г. Новосибирска и Новосибирской области, имеющих русскую национальность в трех поколениях [28].

Геномная ДНК была выделена из 10–15 мл цельной венозной крови по стандартной методике с использованием протеиназы К и последующей фенольно-хлороформной экстракцией, осаждением этанолом.

Выявление полиморфизма Arg72Pro 4-го экзона гена *p53* осуществлялось методом полимеразной цепной реакции полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) (рис. 1). На первом этапе амплифицировали фрагмент гена размером 396 п.н., потенциально содержащий замену нуклеотида, с использованием фланкирующих праймеров: F, 5'-TGG TAA GGA CAA GGG TTG G -3'; R, 5'-ACT GAC CGT GCA AGT CAC AG -3'. Условия ПЦР были следующими: 94 °C — 3 мин, затем 30 циклов: 94 °C — 0,25 мин, 63 °C — 1 мин и 72 °C — 1 мин, заключительный цикл — 72 °C — 3 мин. На втором этапе для рестрикции данного фрагмента использовали эн-

донуклеазу BstFNI, распознающую только дикий Arg-аллель. 10 мкл каждого ампликона брали в реакцию гидролиза с 4 U эндонуклеазы BstFNI в 18 мкл 10X буфера Y (33 ммоль tris-HCl, 10 ммоль ацетата магния, 66 ммоль ацетата калия, 1 ммоль DTT, pH = 7,6) с 7,4 мкл воды при температуре 60 °C в течение 3 ч. Фрагменты рестрикции ампликона ферментом BstFNI были разделены на 3%-м агарозном геле. Известно, что замена G на C в позиции 1042522 нарушает сайт рестрикции эндонуклеазы BstFNI в пределах амплифицированного фрагмента длиной 396 п.н.

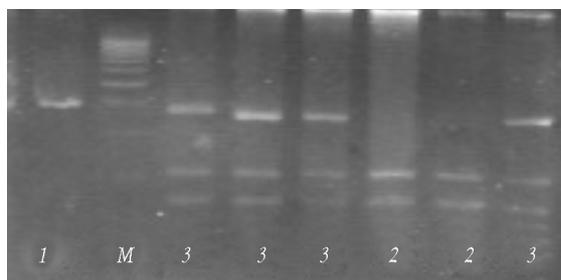


Рис. 1. Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа на выявление гена *p53* экзона 4 кодона 72 полиморфизма CGC > CCC (Arg/Pro): 1 — 396 п.н. (Pro/Pro); 2 — 231 + 165 п.н. (Arg/Arg); 3 — 396 + 231 + 165 п.н.

(Arg/Pro); M — ДНК-маркер по 100 п.н.

Можно различить три генотипа по трем различным картинам полос на электрофореграмме: Arg/Arg (дикий тип), 231 + 165 п.н. (полный гидролиз); Arg/Pro (гетерозиготный), 396 + 231 + 165 п.н.; Pro/Pro (мутантный гомозиготный), 396 п.н.

Типирование образцов на полиморфизм dup16bp 3-го интрона гена *p53* проводилось с использованием аллель-специфичной ПЦР. Амплифицировали фрагмент гена размером 180 п.н., потенциально несущий дупликацию в 16 п.н., с использованием фланкирующих праймеров: F, 5'-GGG ACT GAC TTT CTG CTC TT-3'; R, 5'-TCA AAT CAT CCA TTG CTT GG-3'. Условия ПЦР были следующими: 94 °C — 3 мин, затем 30 циклов: 94 °C — 0,5 мин, 57 °C — 1 мин и 72 °C — 1 мин, заключительный цикл — 72 °C — 3 мин. Состав ампликона был разделен на 12%-м полиакриламидном геле (рис. 2). Можно различить три генотипа по трем различным картинам полос на электрофореграмме: w/w (дикий тип), 180 п.н.; w/m (гетерозиготный), 180 + 196 п.н.; m/m (мутантный гомозиготный), 196 п.н.

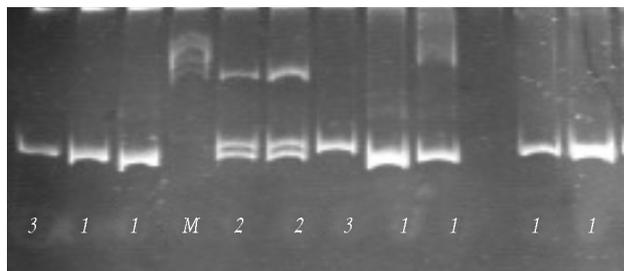


Рис. 2. Результаты аллель-специфичной ПЦР на выявление гена *p53* интрона 3 dup16bp-Полиморфизма: 1 — 180 п.н. (w/w); 2 — — 180 + 196 п.н. (w/m); 3 — 196 п.н. (m/m); M — ДНК-маркер по 100 п.н.

Для выявления полиморфизма G→C 6-го интрона гена *p53* применяли ПЦР-ПДФ-анализ. На первом этапе амплифицировали фрагмент гена размером 404 п.н., потенциально несущий замену нуклеотида. Использовали фланкирующие праймеры: F, 5'-GGC CAT CTA CAA GCA GTC A-3'; R, 5'-TTG CAC ATC TCA TGG GGT TA-3'. Условия ПЦР были следующими: 94 °C — 3 мин, затем 30 циклов: 94 °C — 0,5 мин, 57 °C — 1 мин и 72 °C — 1 мин, заключительный цикл 72 °C — 3 мин. На втором этапе для рестрикции данного фрагмента использовали эндонуклеазу *Msp1*, распознающую только дикий G-аллель. 10 мкл каждого ампликона брали в реакцию гидролиза с 4 U эндонуклеазы *Msp1* в 20 мкл 10X буфера B (10 ммоль tris-HCl, 10 ммоль MgCl₂, 1 ммоль DTT, pH = 7,6) с 7,9 мкл воды при температуре 37 °C в течение 3 ч. Фрагменты рестрикции ампликона ферментом *Msp1* были разделены на 6%-м полиакриламидном геле. Замена G на C в позиции 13964 нарушает сайт рестрикции эндонуклеазы *Msp1* в пределах амплифицированного фрагмента длиной 404 п.н. Можно различить три генотипа по трем различным картинам полос на электрофореграмме: G/G (дикий тип), 336 + 68 п.н. (полный гидролиз); G/C (гетерозиготный), 404 + 336 + 68 п.н.; C/C (гомозиготный мутантный), 404 п.н.

Сравнение частот полиморфизмов гена *p53* между пациентами с НХЗЛ и контрольной груп-

пой проводили с использованием статистических методов: критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера. Корреляционный анализ был выполнен с использованием метода корреляции Спирмена. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым. Для оценки ассоциации Arg72Pro ex4, dup16bp in3 и in6 G/C гена *p53* с риском развития НХЗЛ рассчитывалось отношение шансов (odds ratio — OR) с 95%-м доверительным интервалом (CI).

Результаты и обсуждение

Анализ частоты встречаемости dup16bp 3-го интрона, Arg72Pro 4-го экзона и G→C 6-го интрона гена *p53* у больных НХЗЛ показал, что генотипы G/G, G/C и C/C 6-го интрона гена *p53* были обнаружены у 76 (77,6%), 19 (19,4%) и 3 (3%) из 98 пациентов (таблица). В 78 (78,8%) из 99 случаев был обнаружен нормальный w/w, в 18 (18,2%) — гетерозиготный w/m и в 3 (3%) — гомозиготный мутантный генотип dup16bp 3-го интрона гена *p53*. По 45 (46,4%) пациентов из 97 имели Arg/Arg- и Arg/Pro-генотипы и 7 (7,2%) имели гомозиготный мутантный Pro/Pro-генотип Arg72Pro 4-го экзона гена *p53*. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфизмов *p53* у больных лимфомами соответствовало равновесию Hardy—Weinberg.

Поскольку каждый из полиморфизмов гена *p53* имеет умеренный эффект на функции белка, Mitra и соавт. считают, что необходимо анализировать их сочетания [31]. При комплексном анализе генотипа пациентов с лимфомами по трем полиморфным локусам *p53* была обнаружена сильная положительная корреляционная связь между минорными аллелями in3 и in6 гена *p53* ($r = 0,75$; $p < 0,001$) и умеренная корреляция между Pro-аллелем ex4 и C-аллелем in6 ($r = 0,49$; $p < 0,001$). Это согласуется с данными, опубликованными ранее, которые свидетельствуют об однонаправленности изменений в полиморфных локусах гена *p53* при солидных опухолях [26, 31].

Частота dup16bp in3, Arg72Pro ex4 и G→C in6 гена *p53* у больных НХЗЛ и в контрольной выборке

| Полиморфизм | Контрольная группа | Все НХЗЛ | Агрессивные лимфомы | Индолентные лимфомы |
|-------------|--------------------|----------|---------------------|---------------------|
|-------------|--------------------|----------|---------------------|---------------------|

Фундаментальные и прикладные исследования в онкогематологии

| | | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % | Абс. | % |
|--------------|------------|-----------|------|----------|----|----------|----|----------|------------------|
| dup16bp in3 | | (n = 216) | | (n = 99) | | (n = 43) | | (n = 56) | |
| | w-аллель | 403 | 85 | 174 | 88 | 72 | 84 | 102 | 91 |
| | m-аллель | 69 | 15 | 24 | 12 | 14 | 16 | 10 | 9 |
| | w/w | 155 | 75 | 78 | 79 | 31 | 72 | 47 | 84 |
| | w/m | 53 | 23 | 18 | 18 | 10 | 23 | 8 | 14 |
| | m/m | 8 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 2 |
| Arg72Pro ex4 | | (n = 266) | | (n = 97) | | (n = 43) | | (n = 55) | |
| | Arg-аллель | 363 | 68 | 135 | 70 | 52 | 63 | 82 | 75 |
| | Pro-аллель | 169 | 32 | 59 | 30 | 31 | 37 | 28 | 25 |
| | Arg/Arg | 131 | 49 | 45 | 46 | 15 | 36 | 30 | 55 |
| | Arg/Pro | 101 | 38 | 45 | 46 | 22 | 52 | 22 | 40 |
| | Pro/Pro | 34 | 13 | 7 | 8 | 5 | 12 | 3 | 5 |
| | | | | | | | | | $p_{3-4} = 0,05$ |
| G→C in6 | | (n = 220) | | (n = 98) | | (n = 43) | | (n = 56) | |
| | G-аллель | 341 | 76,5 | 171 | 87 | 69 | 83 | 102 | 91 |
| | C-аллель | 99 | 21,5 | 25 | 13 | 15 | 18 | 10 | 9 |
| | G/G | 136 | 62 | 76 | 78 | 29 | 69 | 47 | 84 |
| | G/C | 69 | 33 | 19 | 19 | 11 | 26 | 8 | 14 |
| | C/C | 15 | 5 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 2 |
| | | | | | | | | | $p_{1-4} < 0,01$ |
| | | | | | | | | | $p_{1-4} < 0,01$ |
| | | | | | | | | | $p_{1-4} < 0,01$ |
| | | | | | | | | | $p_{1-4} < 0,01$ |

Примечание. n – количество человек в группе.

Поскольку НХЗЛ – это гетерогенная группа заболеваний, был проведен сравнительный анализ частоты встречаемости Arg72Pro ex4, dup16bp in3 и in6 G/C гена p53 у пациентов с индолентными и агрессивными вариантами лимфом (см. таблицу). Статистически значимых различий между индолентными и агрессивными вариантами по dup16bp in3 и in6 G/C гена p53 выявлено не было.

Вместе с тем M. Bonafe и соавт. и другие исследователи считают, что Arg72Pro 4-го экзона – один из наиболее важных полиморфизмов гена p53 [10, 11]. Поскольку вариант 72Arg гена p53 имеет более выраженный проапоптотический потенциал, Hsieh и соавт. предполагают, что для реализации онкогенного потенциала клетки, несущие его, должны приобрести соматическую мутацию гена p53 [30]. В связи с тем что мутантный статус гена p53 в дебюте НХЗЛ – редкое явление, роль формы 72Pro гена p53 в лимфогенезе увеличивается.

В обследованной группе было показано уменьшение доли лиц с диким типом (Arg/Arg генотип) 4-го экзона гена p53 среди больных агрессивными лимфомами – 15 (35,7%) из 42 в сравнении с пациентами с индолентными вари-

антами лимфом – 30 (54,5%) из 55 (точный критерий Фишера, $p = 0,050$). Пациенты из группы агрессивных НХЗЛ имели большую частоту Pro-несущих генотипов – 27 (64,3%) из 42, тогда как пациенты из группы индолентных НХЗЛ – лишь 25 (45,6%) из 55 (точный критерий Фишера, $p = 0,050$). Это свидетельствует о том, что пациенты с неходжкинскими лимфомами являются гетерогенной по полиморфизму ex4 Arg72Pro гена p53 группой.

Сила корреляционного взаимодействия между минорными аллелями in3 – in6, in6 – ex4 и in3 – ex4 гена p53 была более значима в группе агрессивных лимфом в сравнении с индолентными НХЗЛ.

Этот факт свидетельствует о том, что при агрессивных вариантах заболевания происходит отбор лиц с сочетанными нарушениями в гене p53. Биологическим смыслом такого отбора является то, что при сочетании минорных аллельных полиморфных вариантов гена p53 происходит нарастание нарушения функционирования соответствующего белка. Так, Wu и соавт., Khrunin и соавт. обнаружили, что в клетках с ассоциацией редких вариантов 3-го и 6-го интронов и 4-го экзона гена p53 происходит значи-

тельное снижение способности клеток к репарации ДНК и апоптозу [16, 32]. Известно, что нормальная функция гена *p53* чрезвычайно важна в быстро делящихся популяциях клеток, которые имеют высокую частоту мутагенеза. При индолентных лимфомах лимфоциты имеют низкую митотическую активность и блок апоптоза за счет гиперэкспрессии *bcl-2* или других причин. В отличие от них субстрат при агрессивных НХЗЛ имеет более высокую пролиферативную и мутационную активность. Таким образом, полиморфизмы гена *p53* при лимфомах высокой степени злокачественности играют более значимую роль. Они создают благоприятные условия для выживания и отбора более агрессивных вариантов клеточных клонов.

После стратификации пациентов по степени злокачественности опухоли и гистологическим вариантам НХЗЛ были выявлены статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена *p53* в обследованной и контрольной выборке.

Наблюдалась гетерогенность по G/C 6-го интрона гена *p53* между пациентами с индолентными вариантами лимфом и популяционным контролем (таблица): пациенты с индолентными лимфомами имели значительно более высокую частоту нормального G/G-генотипа — 47 (83,9%) из 56 против 136 (61,8%) из 220 (точный критерий Фишера, $p = 0,001$) и более низкую частоту G/C-гетерозиготности — 8 (14,3%) из 56 против 69 (31,4%) из 220 (точный критерий Фишера, $p = 0,007$).

Для того чтобы оценить частоту *Arg72Pro ex4, dup16bp in3* и *in6* G/C гена *p53*, у пациентов с различными гистологическими вариантами НХЗЛ были выделены две наиболее часто встречающиеся нозологические формы: диффузная в-мелкоклеточная лимфома (ДВМКЛ) (22 пациента) и диффузная в-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) (14 человек). Обнаружены различия по частоте как экзонного, так и интронных полиморфизмов антионкогена *p53* в этих двух группах.

Пациенты с ДВККЛ имели значительно (χ^2 ; $p < 0,05$) более низкую частоту нормального *Arg/Arg*-генотипа 4-го экзона гена *p53* в сравнении с

больными ДВМКЛ: 3 (21,4%) из 14 против 12 (54,5%) из 22. В группе пациентов с ДВККЛ была значительно (χ^2 ; $p < 0,05$) повышена частота *dup16bp Pro*-варианта *ex4 p53* — 11 (78,6%) из 14 в сравнении с 10 (45,6%) из 22 в группе больных ДВМКЛ (рис. 3).

Кроме того, были обнаружены различия в частоте интронных полиморфизмов гена *p53* у больных лимфомами, которые указывают на статистически значимое (χ^2 ; $p < 0,05$) уменьшение числа лиц, имеющих дикий тип 3-го и 6-го интрона гена *p53* среди пациентов с ДВККЛ в сравнении с больными ДВМКЛ: 7 (50%) и 7 (50%) из 14 против 19 (86,4%) и 18 (81,8%) из 22 соответственно. В группе пациентов ДВККЛ была значительно (χ^2 ; $p < 0,05$) повышена частота *dup16bp in3* и *G/C in6* гена *p53*: 7 (50%) и 7 (50%) из 14 в сравнении с 3 (13,6%) и 4 (18,2%) из 22 при ДВМКЛ соответственно (рис. 3).

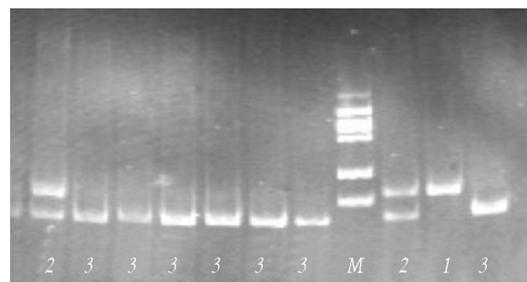


Рис. 3. Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа на выявление гена *p53* интрона 6 G/C-полиморфизма: 1 — 404 п.н. (C/C); 2 — 404 + 336 п.н. (G/C); 3 — 336 + 68 п.н. (G/G); M — ДНК-маркер по 100 п.н.

Значение полиморфизмов в некодирующей последовательности гена *p53* было продемонстрировано в эксперименте. Так, в 2002 г. Wu и соавт. на модели нормальных лимфоцитов здоровых доноров показали, что апоптотический индекс клеток значительно уменьшается с увеличением числа минорных аллелей 3-го и 6-го интрона гена *p53* [16].

Отсутствие статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов *Arg72Pro ex4, dup16bp in3* и *in6* G/C гена *p53* между пациентами с НХЗЛ и популяционной выборкой не отрицало их роли в лимфомогенезе. НХЗЛ — гетерогенная группа заболеваний, которые имеют широкий генетический полиморфизм. По

этой причине все больные были разделены на группы согласно варианту НХЗЛ и сравнены с контролем. Это позволило выявить склонность к развитию ДВКЛ у лиц с Pro-несущими генотипами 72-го кодона (OR = 3,67; CI = 1,00–13,44; $p < 0,05$) и m-аллелем in6 (OR = 5,56; CI = 2,25–13,7; $p < 0,05$) гена p53, что подтверждает более значимую роль Arg72Pro ex4, in3 dup16bp гена p53 при агрессивных НХЗЛ. В то же время лица с G-аллелем in6 гена p53 имели большую склонность к ДВМКЛ по сравнению с лицами контрольной группы (OR = 2,9; CI = 1,01–8,31; $p < 0,05$).

Для того чтобы установить влияние Arg72Pro ex4, dup16bp in3 и in6 G/C гена p53 на прогноз, была исследована ассоциация данных полиморфизмов с прогнозом согласно Международному прогностическому индексу (IPI).

Так как каждый из полиморфизмов p53 в отдельности не был связан с прогнозом, результаты исследования свидетельствуют, что пациенты с сочетанием минорных аллелей in3, in6 и ex4 гена p53 имели тенденцию к ухудшению прогноза по сравнению с лицами с нормальным гомозиготным генотипом по данным локусам. Они в 4 раза (7 (53,8%) из 13 против 6 (14,6%) из 41; точный критерий Фишера, $p = 0,028$) чаще относились к группе промежуточного (высокого) риска раннего прогрессирования заболевания согласно IPI. Таким образом, результаты показывают умеренный эффект на прогноз каждого из полиморфизмов гена p53 в отдельности, а также необходимость сочетанного анализа Arg72Pro ex4, dup16bp in3 и in6 G/C гена p53 для оценки их результирующего влияния. Причина, по которой больные НХЗЛ с сочетанием минорных аллелей in3, in6 и ex4 гена p53 имели тенденцию к более плохому прогнозу и больший риск раннего прогрессирования заболевания согласно IPI, также может заключаться в том, что у данных лиц в большей степени нарушена деятельность белка p53. Это создает условия для выживания и отбора более агрессивных вариантов клеточных клонов.

Заключение

Известно, что у больных НХЗЛ частота мутантного статуса p53, который считается основ-

ным антионкогеном человека, в сравнении с больными солидными опухолями уменьшена [7–9]. По этой причине олигонуклеотидные полиморфизмы гена p53 могут быть потенциальными молекулярными маркерами, связанными с предрасположенностью к НХЗЛ и прогнозом при данной форме гемобластозов.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что больные неходжкинскими лимфомами представляют собой гетерогенную по полиморфизмам гена p53 группу и дают возможность предположить различные механизмы участия Arg72Pro ex4, dup16bp in3 и in6 G/C гена p53 в патогенезе агрессивных и индолентных вариантов НХЗЛ. Полученные данные свидетельствуют о большем значении нарушений в полиморфных локусах in3 и ex4 гена p53 и отборе лиц, несущих сочетанные нарушения в полиморфных локусах данного гена, при лимфомах высокой степени злокачественности. В то же время показана большая роль изменений в in6 гена p53 при индолентных НХЗЛ.

Необходимы дальнейшие исследования для определения биологического механизма и клинического значения того или иного аллеля полиморфных локусов гена p53.

Литература

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М.А. Волковой. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2007. 1120 с.
2. Jemal A., Siegel R., Ward E. et al. Cancer Statistics // Cancer Journal for Clinicians. 2006. V. 56. P. 106–130.
3. Имянитов Е.Н. Наследственная предрасположенность к онкологическим заболеваниям // Молекул.-биол. технологии в мед. практике. 2007. № 11. С. 12–15.
4. Thiagalingam S.A. Cascade of modules of a network defines cancer progression // Cancer Res. 2006. V. 66 (15). P. 7379–7385.
5. Bunz F., Hwang P.M., Torraine C. et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents // J. Clin. Invest. 1999. V. 104. P. 263–269.
6. Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types // Nature. 1989. V. 342. P. 705–708.
7. Bellido M., Capello D., Altas A. et al. Bcl-6 p53 mutations in lymphomas carrying the bcl-2/Jh rearrangement // Haematologica. 2002. V. 87 (9). P. 908–917.
8. Scorpa A., Moore P.S., Rigaud G. et al. Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc // Br. J. Haematol. 1999. V. 107 (1). P. 106–113.
9. Gaidano G., Volpe G., Pastore C. et al. Detection of BCL-6

- rearrangements and p53 mutations in Malt-lymphomas // *Am. J. Hematol.* 1997. V. 56 (4). P. 206—213.
10. **Bonafe M., Salvioli M., Barbi C. et al.** The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates *in vivo* ischaemia-induced cell death // *Cell Death. Differ.* 2004. V. 11 (9). P. 962—973.
 11. **Dumont P., Leu J.I., Della Pietra A.C. et al.** The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential // *Nat. Genet.* 2003. V. 33 (3). P. 357—365.
 12. **Sullivan A., Syed N., Gasco M. et al.** Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy *in vitro* and *in vivo* // *Oncogene.* 2004. V. 23 (19). P. 3328—3337.
 13. **Lazar V., Hazard F., Bertin F. et al.** Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene // *Oncogene.* 1993. V. 8. P. 1703—1705.
 14. **Peller S., Kopilova Y., Slutzki S. et al.** A novel polymorphism in intron 6 of the human p53 gene: a possible association with cancer predisposition and susceptibility // *DNA Cell Biol.* 1995. V. 14 (12). P. 983—990.
 15. **Ghosh A., Deborah S.D., Matlashewski G. et al.** Regulation of Human p53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24 (18). P. 7987—7997.
 16. **Wu X., Zhao H., Amos C.I. et al.** p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity // *J. Natl. Cancer Inst.* 2002. V. 94 (9). P. 681—690.
 17. **Endoh C., Satoh M., Chin E. et al.** Aberrations of the p53 gene in roentgenographically occult squamous cell carcinoma of the lung // *Kyobu Geka.* 1996. V. 49. P. 990—993.
 18. **Murata M., Tagawa M., Kimura H. et al.** Correlation of the mutation of p53 gene and the polymorphism at codon 72 in smoking-related non-small cell lung cancer patients // *Int. J. Oncol.* 1998. V. 12 (3). P. 577—581.
 19. **Huang X.E., Hamajima N., Katsuda N. et al.** Association of p53 codon Arg72Pro and p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 genetic polymorphisms with the risk of Japanese breast cancer // *Breast. Cancer.* 2003. V. 10 (4). P. 307—311.
 20. **Bastiaens M.T., Struyk L., Tjong-A-Hung S.P. et al.** Cutaneous squamous cell carcinoma and p53 codon 72 polymorphism: a need for screening? // *Mol. Carcinog.* 2001. V. 30 (1). P. 56—61.
 21. **Lehman T.A., Haffty B.G., Carbone C.J. et al.** Elevated Frequency and Functional Activity of a Specific Germ-Line p53 Intron Mutation in Familial Breast Cancer // *Cancer Research.* 2000. V. 60. P. 1062—1069.
 22. **Lancaster J.M., Brownlee H.A., Wiseman R.W. et al.** p53 polymorphism in ovarian and bladder cancer // *Lancet.* 1995. V. 346 (8968). P. 182.
 23. **Campbell I.G., Eccles D.M., Dunn B. et al.** p53 polymorphism in ovarian and breast cancer // *Lancet.* 1996. V. 347 (8998). P. 393—394.
 24. **Mavridou D., Gornall R., Campbell I.G. et al.** TP53 intron 6 polymorphism and the risk of ovarian and breast cancer // *Br. J. Cancer.* 1998. V. 77 (4). P. 676—677.
 25. **Gemignani F., Moreno V., Landi S. et al.** A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA // *Oncogene.* 2004. V. 23 (10). P. 1954—1956.
 26. **Mitra S., Sikdar N., Misra C. et al.** Risk assessment of p53 genotypes and haplotypes in tobacco-associated leukoplakia and oral cancer patients from eastern India // *Int. J. Cancer.* 2005. V. 117 (5). P. 786—793.
 27. **Tada M., Furuuchi K., Kaneda M. et al.** Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not trans-dominant mutants // *Cancerogenesis.* 2001. V. 22 (3). P. 515—517.
 28. **Сметанникова Н.А., Белявская В.А., Казначеев К.С. и др.** Генотипы и гаплотипы гена-онкосупрессора p53: ассоциация с продолжительностью жизни у русских Новосибирской области // *Сиб. онкол. журн.* 2006. № 2. С. 37—41.
 29. **Sjilander A., Birgander R., Athlin L. et al.** p53 germ-line haplotypes associated with increased risk for colorectal cancer // *Carcinogenesis.* 1995. V. 16. P. 1461—1464.
 30. **Hsieh L.L., Huang T.H., Chen I.H. et al.** p53 polymorphisms associated with mutations in and loss of heterozygosity of the p53 gene in male oral squamous cell carcinomas in Taiwan // *Br. J. Cancer.* 2005. V. 92 (1). P. 30—35.
 31. **Mitra S., Misra C., Singh R.K. et al.** Association of specific genotype and haplotype of p53 gene with cervical cancer in India // *J. Clin. Pathol.* 2005. V. 58 (1). P. 26—31.
 32. **Khrunin A.V., Tarskaia L.A., Spitsyn V.A. et al.** p53 polymorphisms in Russia and Belarus: correlation of the 2-1-1 haplotype frequency with longitude // *Mol. Genet. Genomics.* 2005. V. 272 (6). P. 666—672.