

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

**Поспелова Т.И., Воевода М.И., Воропаева Е.Н., Белявская В.А.,
Ковынев И.Б., Березина О.В.**

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

**Pospelova T.I., Voyevoda M.I., Voropayeva 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*

© Поспелова Т.И., Воевода М.И., Воропаева Е.Н. 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 C [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 K 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.

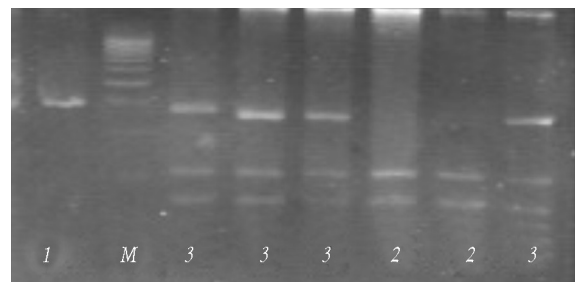


Рис. 1. Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа на выявление гена *p53* экзона 4 кодона 72 полиморфизма CGC > CCC (Arg/Pro): 1 — 396 п.н. (Pro/Pro); 2 — 231 + 165 п.н. (Arg/Arg); 3 — 396 + 231 + 165 п.н.

(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.

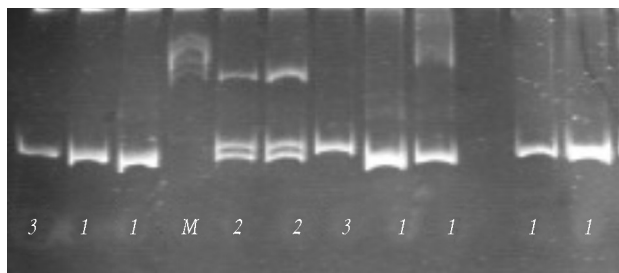


Рис. 2. Результаты аллель-специфичной ПЦР на выявление гена *p53* интрона 3 dup16bp-полиморфизма: 1 — 180 п.н. (w/w); 2 — — 180 + 196 п.н. (w/m); 3 — 196 п.н. (m/m); M — ДНК-маркер по 100 п.н.

Для выявления полиморфизма G→C 6-го интрона гена *p53* применяли ПЦР-ПДРФ-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 *MspI*, распознающую только дикий G-аллель. 10 мкл каждого ампликона брали в реакцию гидролиза с 4 U эндонуклеазы *MspI* в 20 мкл 10X буфера в (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 *MspI* были разделены на 6%-м полиакриламидном геле. Замена G на C в позиции 13964 нарушает сайт рестрикции эндонуклеазы *MspI* 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
-------------	--------------------	----------	---------------------	---------------------

		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).

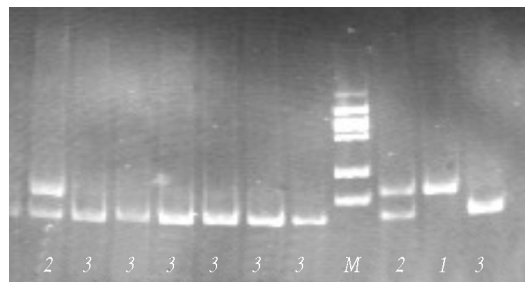


Рис. 3. Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа на выявление гена *p53* интрона 6 G/C-полиморфизма: 1 — 404 п.н. (C/C); 2 — 404 + 336 п.н. (G/C); 3 — 336 + 68 п.н. (G/G); M — ДНК-маркер по 100 п.н.

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 ДВККЛ 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* по 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., Torrance 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., Altes 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. Sjolander 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.