

УДК: 616.98[578.825-616.155.392]:614.876

А. А. Чумак, Н. І. Білоус, Г. В. Плескач, З. В. Мартіна,  
І. С. Дягіль, І. В. Абраменко\*

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини  
Національної академії медичних наук України”,  
53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

**ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ГЕНОТИПІВ  
rs966221 ГЕНА PDE4D У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ  
ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ З УРАХУВАННЯМ  
РАДІАЦІЙНОГО АНАМНЕЗУ**

Поліморфізм rs966221 гена PDE4D вивчено у 123 хворих на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) і 242 осіб контрольної групи. Виявлено зниження частоти генотипу СС серед хворих на ХЛЛ, які не мали в анамнезі впливу іонізуючого випромінення (26%), порівняно з хворими на ХЛЛ, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи (43,4%;  $p=0,041$ ), і особами контрольної групи (38,4%;  $p=0,06$ ). Встановлена асоціація генотипу СС з немутованим статусом (UM) генів варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів (IGHV), а також зниженням частоти виявлення UM IGHV 1-ї родини серед хворих на ХЛЛ з радіаційним впливом в анамнезі. Висловлено припущення щодо наявності особливостей формування клону лейкозних клітин при ХЛЛ у носіїв різних генотипів rs966221 гена PDE4D на фоні впливу іонізуючого випромінення.

**Ключові слова:** Чорнобильська аварія, хронічна лімфоцитарна лейкемія, іонізуюче випромінення, поліморфізм rs966221 гена PDE4D.

Враховуючи результати попередніх досліджень, які вказують на значення антигенних стимулів в патогенезі ХЛЛ [1], нами висловлена робоча гіпотеза, що в умовах певного генетичного фону, характерного для популяції кавказьків в цілому, на ризик виникнення ХЛЛ впливають додаткові генетичні чинники, які сприяють персистенції атоантігенів в організмі та активації аутоімунного процесу. Одними з них є гени, що кодують фосфодіестерази і беруть участь в регуляції процесів активації та проліферації В- і Т-лімфоцитів. Фосфодіестерази (PDE) —

\* Абраменко Ірина Вікторівна, e-mail: nbilous@yahoo.com

© Чумак А. А., Білоус Н. І., Плескач Г. В., Мартіна З. В., Дягіль І. С., Абраменко І. В., 2012

родина фосфогідролаз, які селективно гідролізують 3' фосфатні зв'язки у складі циклічного аденоzin- та/або гуанідин-3'5'-монофосфата (cAMP, cGMP). Тим самим вони регулюють концентрацію, локалізацію та тривалість дії цих універсальних вторинних месенджерів, які є ключовими молекулами багатьох фізіологічних процесів. Склад ізоформ PDE розрізняється залежно від типу клітин. Так, в цитозолі CD8<sup>+</sup> і CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцитів виявлено PDE4 та PDE3, в незначній кількості — PDE1, PDE2 та PDE5 [2]. У фракції очищених CD19<sup>+</sup> В-клітин переважають ізоформи PDE4 (PDE4A, PDE4B та PDE4D) і PDE7, в меншій кількості виявляється PDE3, відсутні ізоформи PDE1, PDE2 і PDE5 [3]. На відміну від лімфоцитів практично здорових донорів, в клітинах хворих на ХЛЛ переважають ізоформи PDE4 і PDE7, а ізоформи PDE3 практично відсутні [4]. Дослідження поліморфізмів гена PDE4D при ХЛЛ раніше не проводилося.

**Мета роботи** полягала у визначенні генетичної схильності до розвитку хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ), зокрема під впливом іонізуючого випромінення (ІВ), залежно від генотипів rs966221 гена PDE4D.

**Матеріали і методи дослідження.** Визначення поліморфізму rs966221гена PDE4D проведено у 126 хворих на ХЛЛ В-клітинного походження: 93 чоловіків (73,8%) і 33 жінок (26,2%) у віці від 29 до 86 років на момент діагнозу (середній вік ( $57,22 \pm 0,87$ ) року, медіана 58 років). Діагноз ХЛЛ встановлювали на основі клініко-гематологічних критеріїв та імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові — виявлення типового фенотипу CD5<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD22<sup>low</sup> (проведено в лабораторії імуноцитології відділу клінічної імунології ДУ „ННЦРМ НАМН України” під керівництвом чл-кор. НАМН, д. мед. н., проф. Д. А. Базики). Стадію захворювання визначали за класифікаціями К. R. Rai et al. [5, 6], J. L. Binet et al. [7] та класифікацією Міжнародної робочої наради з ХЛЛ 1989 р. [8]. У 123 пацієнтів був досліджений мутаційний статус генів варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів (IGHV), як було описано раніше [9].

Основну групу (група I) складали 53 опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи осіб (48 чоловіків і 5 жінок, середній вік — ( $57,62 \pm 1,3$ ) року). Серед них 4 евакуйованих з м. Прип'ять, 5 мешканців контролюваних територій, забруднених радіонуклідами, 44 учасники ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС (ЛНА): 38 — учасники ЛНА 1986 р., 3 — 1987 р. і 3 — 1988–1989 рр.

Хворі на ХЛП ( $n=73$ ), які не мали в анамнезі впливу ІВ, складали II групу. До її складу входило 45 чоловіків (61,6%) та 28 жінок (38,4%), середній вік —  $(56,93 \pm 1,18)$  року.

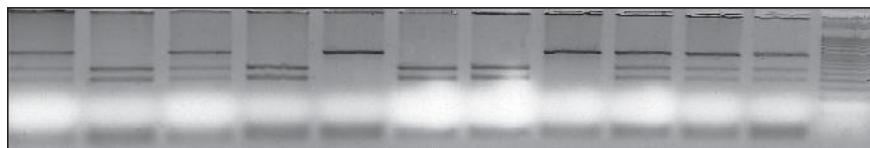
Третя, контрольна група, складалася з двох підгруп: підгрупи IIIa зі 133 постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, серед яких 117 чоловіків (88%) та 16 жінок (12%) у віці  $(60,57 \pm 0,74)$  року, та підгрупи IIIb — 109 осіб без впливу ІВ в анамнезі: 63 чоловіки (57,8%) та 46 жінок (42,2%) у віці  $(67,63 \pm 1,22)$  року.

Визначення поліморфізму rs966221 гена PDE4D проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією отриманих продуктів. Використовували праймери згідно з Saleheen et al. [10]. Ампліфікацію проводили на термоциклері 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems, США) в наступному режимі: ініціація: —  $95^{\circ}\text{C}$ , 10 хв, потім 30 циклів ампліфікації ( $95^{\circ}\text{C}$  — 1 хв,  $56^{\circ}\text{C}$  — 1 хв,  $72^{\circ}\text{C}$  — 1 хв), фінальна елонгація  $72^{\circ}\text{C}$  — 10 хв. Склад суміші для ампліфікації (загальний об'єм 30 мкл): зразок ДНК — 100–400 нг,  $\text{MgCl}_2$  — 1,67 ммоль/л, дезоксинуклеозидтрифосфати — 2 ммоль/л, полімераза Taq (Applied Biosystems, США) — 1 ОД, праймери — 10 пмоль/л.

Рестрикцію продуктів реакції проводили за допомогою рестриктази *TaiI* (Fermentas, Латвія; сайт рестрикції ACGT) при температурі  $65^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Поліморфні варіанти гена визначали шляхом електрофорезу: за наявності алелі T рестрикція продукту реакції не відбувалась (продукт 492 п. о.), за наявності поліморфної алелі C — виявляли 2 фрагменти (204 п. о. та 288 п. о.) (рис. 1).

Статистичну обробку даних проводили у програмі SPSS 13.0 software package (SPSS, США).

**Результати та їх обговорення.** Розподіл генотипів rs966221 гена PDE4D в усіх групах обстежених осіб підпорядковувався закону Харді–Вайнберга, про що свідчило значення статистики  $\chi^2 < 3,85$  (табл. 1). За розподілом генотипів контрольні підгрупи IIIa та IIIb не розрізня-



**Рис. 1.** Результати визначення поліморфізму rs966221 гена PDE4D методом полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією отриманих продуктів рестриктазою *TaiI*. M — маркери молекулярної маси

Таблиця 1. Розподіл генотипів rs966221 гена PDE4D, частота поліморфної алелі та відповідність розподілу генотипів рівнянню Харді-Вайнберга серед обстежених осіб контрольних груп і хворих на ХЛЛ (показник  $\chi^2$ ), кількість обстежених (%)

Групи обстежених осіб	Генотипи гена PDE4D, %				$\chi^2$
	TT	TC	CC	частота поліморфної алелі	
Всі хворі на ХЛЛ, n=126	25 (19,8)	59 (46,8)	42 (33,3)	0,57	0,27
Вся контрольна група III, n=242	34 (14,0)	115 (47,5)	93 (38,4)	0,62	0,111
Хворі на ХЛЛ, I група, n=53	11 (20,8)	19 (35,8)	23 (43,4)	0,61	3,16
Контрольна підгрупа IIIa, n=133	18 (13,5)	65 (48,9)	50 (37,6)	0,61	0,934
Хворі на ХЛЛ, II група, n=73	14 (19,2)	40 (54,8)	19 (26,0)	0,53	0,75
Контрольна підгрупа IIIb, n=109	16 (14,7)	50 (45,9)	43 (39,4)	0,62	0,06

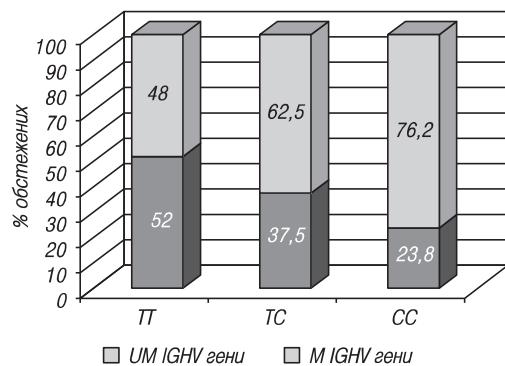
лись ( $p=0,894$ ). Також не виявлено розбіжностей у розподілі генотипів між основною (І) групою та контрольною підгрупою IIIa ( $p=0,18$ ) і між ІІ групою і контрольною підгрупою IIIb ( $p=0,16$ ).

Найнижча частота гомозигот CC за поліморфною алеллю гена PDE4D серед обстежених осіб виявлена в групі ІІ (хворі на ХЛЛ, які не мали в анамнезі впливу IB) — (26%), що достовірно відрізнялось від частоти носіїв CC генотипу в основній групі (43,4%,  $p=0,041$ ), а також в контрольній підгрупі IIIb (39,4%,  $p=0,06$ ).

При співставленні з важливою молекулярно-генетичною характеристикою лейкемічних клітин при ХЛЛ — мутаційним статусомIGHV генів — виявилось, що носії окремих генотипів rs966221 гена PDE4D суттєво розрізнялися за співвідношенням випадків захворювання з мутованими (M) і немутованими (UM) IGHV генами. Серед носіїв генотипу TT співвідношення M/ UM генів наблизжалось до 1, зменшувалось серед гетерозигот і було мінімальним (0,31) серед носіїв генотипу CC (рис. 2).

Збільшення кількості випадків ХЛЛ з UM IGHV генами серед носіїв поліморфної алелі порівняно з носіями неполіморфної алелі ( $p=0,01$ ) та серед гомозигот CC порівняно з носіями інших генотипів ( $p=0,04$ ) було вірогідним.

Ми також виявили деякі розбіжності у розподілі окремих родин IGHV генів залежно від носійства генотипів rs966221 гена PDE4D і радіаційного анамнезу хворих.



**Рис. 2.** Частота мутованих (М) і немутованих (УМ) IGHV генів серед хворих на ХЛЛ, носіїв різних генотипів rs966221 гена PDE4D

хворих на ХЛЛ, носіїв генотипу СС, була збільшена частота УМ IGHV генів 3-ї родини ( $p=0,016$ ).

Серед пацієнтів з УМ IGHV генами у гомозигот СС виявлявся найширший спектр IGHV генів 3-ї родини: 11 генів з 12 присутніх по групі, тоді як у носіїв інших генотипів кількість виявленіх окремих генів 3-ї родини була меншою: 6 генів у носіїв генотипу ТС, 4 гени — при генотипі ТТ. Широкий спектр УМ IGHV генів 3-ї родини був притаманний саме хворим І групи, носіїв СС генотипу: в них виявлено 9 окремих генів 3-ї родини, тоді як серед неопромінених пацієнтів — тільки 4.

Водночас, частота окремих IGHV генів 3-ї родини не відрізнялась у носіїв окремих генотипів, за винятком підвищення частоти гена IGHV3-64 при генотипі СС ( $p=0,03$ ). Частота гена УМ IGHV4-34 мала тенденцію до збільшення серед носіїв генотипу ТС порівняно з носіями інших генотипів ( $p=0,047$ ).

Серед пацієнтів з М IGHV генами у гомозигот СС частіше виявлена експресія гена IGHV3-15 з носіями інших генотипів ( $p=0,007$ ).

Розбіжностей в розподілі випадків ХЛЛ зі стереотипними В-клітинними рецепторами, а також випадків, що показують гомологію з імуноглобулінами іншої специфічності (спрямовані проти вірусних, бактеріальних антигенів, аутоантигенів) залежно від генотипів rs966221 гена PDE4D, не виявлено.

Можливим поясненням виявлених розбіжностей в молекулярно-генетичних ознаках лейкемічних клітин хворих на ХЛЛ, носіїв різних

так, серед хворих на ХЛЛ І групи порівняно з хворими ІІ групи серед носіїв генотипу СС була знижена частота УМ IGHV генів 1-ї родини (17,6% проти 66,7%,  $p<0,001$ ) та підвищена частота УМ IGHV генів 3-ї родини (64,7% проти 26,7%,  $p<0,001$ ). Розподіл родин УМ IGHV генів серед носіїв генотипів СТ та ТТ у хворих І та ІІ груп достовірно не розрізнявся. За рахунок саме опромінених хворих в цілому серед

генотипів rs966221 гена PDE4D, є вірогідний вплив даного поліморфізму на процес презентації антигенів В-клітинам та наступних етапів активації. В літературі є певні докази значення особливостей перебігу імунорегуляторних процесів для розвитку ХЛЛ. Так, поліморфізми генів, продукти яких задіяні в активації Т-лімфоцитів та взаємодії Т- і В-клітин, асоційовані з генетичною схильністю до розвитку ХЛЛ. Це стосується поліморфізмів генів CTLA-4, CD28 [11], KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors) [12], IRF4 (interferon regulatory factor 4), ACOXL (acyl-Coenzyme A oxidase-like) [13]. Фермент PDE4D задіяний в регуляцію імунної відповіді Т-клітин та є критичним в регуляції передачі внутрішньоклітинного сигналу при стимуляції Т-клітинного рецептора. Встановлено, що пригнічення активності PDE4D призводить до значного зменшення секреції цитокінів — інтерлейкінів-2, 5, гамма-інтерферону [14]. Можна припустити, що за наявності певних поліморфізмів, які впливають на концентрацію PDE4D в клітині, існують розбіжності у розвитку імунної відповіді на певні антигени, Т-залежні та Т-незалежні, з переважною відповіддю на один з двох типів антигенів, що відображається на репертуарі антигенної специфічності лейкемічних клітин при ХЛЛ та структурі імуноглобулінового рецептору. Так, відомо, що лейкемічні клітини хворих на ХЛЛ з UM IGHV генами розпізнають, головним чином, Т-незалежні антигени [15], а молекули імуноглобулінів на основі UM IGHV генів 3-ї родини, внаслідок консервативної структури ділянок FR1 та FR3, — В-клітинні суперантигени [16].

Непрямим підтвердженням нашого припущення є встановлений вплив поліморфізмів PDE4D на схильність до розвитку алергічних захворювань, зокрема, бронхіальної астми, що пов'язують з порушеннями Т-клітинної відповіді на антигенні стимули [17].

Таким чином, нами виявлені певні відмінності в розподілі генотипів PDE4D серед опромінених і неопромінених хворих на ХЛЛ, а також асоціацію генотипу СС з UM IGHV генами, насамперед 3-ї родини, в групі хворих, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи. Це може свідчити про наявність певних особливостей формування клону лейкемічних клітин при ХЛЛ за умов дії іонізуючого випромінення у носіїв різних генотипів rs966221 гена PDE4D.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Antigens in chronic lymphocytic leukemia--implications for cell origin and leukemogenesis / A. Rosen, F. Murray, C. Evaldsson, R. Rosenquist // Semin. Cancer Biol. — 2010. — Vol. 20. — P. 400—409.

2. Conti M. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling / M. Conti, J. Beavo // Annu. Rev. Biochem. — 2007. — Vol. 76. — P. 481–511.
3. Phosphodiesterase profile of human B lymphocytes from normal and atopic donors and the effects of PDE inhibition on B cell proliferation / F. Gantner, C. Gotz, V. Gekeler [et al.] // Br. J. Pharmacol. — 1998. — Vol. 123, N 6. — P. 1031–1038.
4. Meyers J. A. Chronic lymphocytic leukemia and B and T cells differ in their response to cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors / J. A. Meyers, D. W. Su, A. Lerner // J. Immun. — 2009. — Vol. 182, N 9. — P. 5400–5411.
5. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia / K. R. Rai, A. Sawitzky, E. P. Cronkite [et al.] // Blood. — 1975. — Vol. 46, N 2. — P. 219–234.
6. Rai K. R. A critical analysis of staging in CLL. Chronic lymphocytic leukemia. Recent progress and future direction / K. R. Rai. — New York : Alan R Liss, 1987. — 253 p.
7. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multi-variate survival analysis / J. L. Binet, A. Auguier, G. Dighiero [et al.] // Cancer. — 1981. — Vol. 48, N 1. — P. 198–205.
8. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria // Ann. Intern. Med. — 1989. — Vol. 110. — P. 236–238.
9. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident — with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis / I. Abramenko, N. Bilous, A. Chumak [et al.] // Leukemia Res. — 2008. — Vol. 32, N 4. — P. 535–542.
10. Association of phosphodiesterase 4D gene with ischemic stroke in a Pakistan population / D. Saleheen, S. Bukhari, S. R. Haider [et al.] // Stroke. — 2005. — Vol. 36. — P. 2270–2277.
11. Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with B-cell chronic lymphocytic leukemia in the Polish population / K. Suwalska, E. Pawlak, L. Karabon [et al.] // Hum. Immunol. — 2008. — Vol. 69. — P. 193–201.
12. KIR/HLA gene combinations influence susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia and the clinical course of disease / L. Karabon, A. Jedynak, S. Giebel [et al.] // Tissue Antigens. — 2011. — Vol. 78, N 2. — P. 129–138.
13. Genetic susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia / S. L. Slager, L. R. Goldin, S. S. Strom [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2010. — Vol. 19, N 4. — P. 1098–1102.
14. Differential Expression and Function of Phosphodiesterase 4 (PDE4) Subtypes in Human Primary CD4<sup>+</sup> T Cells: Predominant Role of PDE4D / P. Daniel, S. L. C. Jin, A. Gatzelmann, Ch. Zitt // J. Immunol. — 2007. — Vol. 178, N 8. — P. 4820–4831.
15. A different ontogenesis for chronic lymphocytic leukemia cases carrying stereotyped antigen receptors: molecular and computational evidence / N. Darzentas, A. Hadzidimitriou, F. Murray [et al.] // Leukemia. — 2010. — Vol. 24, N 1. — P. 125–132.
16. Buhler A. Immunoglobulin heavy chain variable gene usage and (super)-antigen drive in chronic lymphocytic leukemia / A. Buhler, T. Zenz, S. Stilgenbauer // Clin. Cancer Res. — 2010. — Vol. 16, N 2. — P. 373–375.
17. Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene / B. E. Himes, G. M. Hunninghake, J. W. Baurley [et al.] // Am. J. Hum. Genet. — 2009. — Vol. 84. — P. 581–593.

Стаття надійшла до редакції 04.07.2012.

*A. A. Чумак, Н. І. Билоус, Г. В. Плескач, З. В. Мартіна,  
І. С. Дягиль, І. В. Абраменко*

*Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной  
медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,  
ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина*

**ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ rs966221  
ГЕНА PDE4D У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ  
С УЧЕТОМ РАДИАЦИОННОГО АНАМНЕЗА**

Полиморфизм rs966221 гена PDE4D изучен у 123 больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и 242 лиц контрольной группы. Выявлено снижение частоты генотипа CC среди больных ХЛЛ, не имевших в анамнезе воздействия ионизирующего излучения (26%), по сравнению с больными ХЛЛ, пострадавшими в результате аварии на ЧАЭС (43,4%;  $p=0,041$ ), и лицами контрольной группы (38,4%;  $p=0,06$ ). Установлена ассоциация генотипа CC с немутинированным статусом (UM) генов вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGHV), а также снижением частоты встречаемости UM IGHV 1-го семейства среди больных ХЛЛ с радиационным воздействием в анамнезе. Высказано предположение о наличии особенностей формирования клона лейкозных клеток при ХЛЛ у носителей различных генотипов rs966221 гена PDE4D на фоне воздействия ионизирующего излучения.

**Ключевые слова:** Чернобыльская авария, хронический лимфолейкоз, ионизирующее излучение, полиморфизм rs966221 гена PDE4D.

*A. A. Chumak, N. I. Bilous, G. V. Pleskach, Z. V. Martina,  
I. S. Dyagil, I. V. Abramenko*

*State Institution “National Research Center for Radiation Medicine  
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,  
Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine*

**THE DISTRIBUTION OF rs966221 PDE4D GENE'S GENOTYPES  
IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS DEPENDING  
ON RADIATION ANAMNESIS**

The rs966221 PDE4D gene's polymorphism was studied in 123 chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients and 242 controls. The lower frequency of CC genotype was revealed in ionizing radiation (IR) non-exposed CLL patients (26%;  $p=0.041$ ) comparing with IR-exposed CLL patients (43.4%) and controls (38.4%;  $p=0.06$ ). The association of CC genotype with unmutated variable heavy chain genes (UM IGHV) and lower frequency of UM IGHV1 gene family in IR-exposed CLL patients was found. The assumption about some peculiarities of leukemic CLL clone formation in carriers of different rs966221 genotypes under IR influence was proposed.

**Key words:** Chernobyl NPP accident, chronic lymphocytic leukemia, ionizing radiation, rs966221 PDE4D gene's polymorphism.