

УДК 577.2:616.155.392:616-001.28

Н. І. Білоус, І. В. Абраменко, А. А. Чумак✉, І. С. Дягіль, З. В. Мартіна

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

ПОЛІМОРФІЗМИ ГЕНІВ P53-ОПОСЕРЕДКОВАНОГО АПОПТОЗУ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ: ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ ЗАЛЕЖНО ВІД РАДІАЦІЙНОГО ЧИННИКА В АНАМНЕЗІ

Мета роботи. Встановити значення поліморфізмів генів p53-опосередкованого апоптозу (*TP53* кодон 72 Arg/Pro, *p21* кодон 31 Ser/Arg, *MDM2* SNP309) для виникнення хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ) в осіб, які зазнали впливу іонізуючого випромінювання (ІВ) внаслідок Чорнобильської катастрофи.

Методи. Визначення поліморфізмів p53-опосередкованого апоптозу проведено у 320 хворих на ХЛЛ В-клітинного походження: 107 опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи пацієнтів, 213 хворих на ХЛЛ, які не мали в анамнезі впливу ІВ, 73 осіб без наявності онкологічних та онкогематологічних захворювань, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи, та 72 мешканців м. Києва без впливу ІВ в анамнезі. Визначення поліморфізмів p53-опосередкованого апоптозу проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією.

Результати. Розподіл генотипів у хворих на ХЛЛ не відрізнявся від контролю, за винятком зменшення частоти гомозигот Arg/Arg *TP53* серед хворих на ХЛЛ ($p = 0,01$). У порівнянні з неопроміненими хворими на ХЛЛ, у підгрупі хворих, постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, знайдено збільшення частоти поліморфної алелі гена *p21* ($p = 0,033$), насамперед у комбінації з алеллю Arg (генотипи Arg/Arg і Arg/Pro) гена *TP53* і генотипом TT SNP309 гена *MDM2* ($p = 0,009$).

Висновок. Проведені попередні дослідження свідчать про вірогідний внесок поліморфізму rs1801270 гена *p21* в патогенез ХЛЛ у осіб, які зазнали впливу ІВ. Впливу поліморфізмів rs1042522 гена *TP53* та SNP309 гена *MDM2* на ризик розвитку ХЛЛ у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС не виявлено.

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, p53-опосередкований апоптоз, поліморфізм, гени *TP53*, *p21*, *MDM2*, іонізуюче випромінювання.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 14. С. 223–230.

N. I. Bilous, I. V. Abramenko, A. A. Chumak✉, I. S. Dyagil, Z. V. Martina

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

Gene polymorphisms of p53-mediated apoptosis in chronic lymphocytic leukemia patients: features of distribution depending on radiation factor in anamnesis

Objective. To set of p53-mediated apoptosis gene polymorphisms (*TP53* codon 72 Arg/Pro, *p21* codon 31 Ser/Arg, *MDM2* SNP309) for the occurrence of CLL in patients who were exposed to ionizing radiation (IR) from the Chernobyl accident.

Methods. Polymorphisms of p53-mediated apoptosis were determined in 320 patients with CLL of B-cell origin: 107 irradiated by the Chernobyl accident patients, 213 patients with CLL who had no history of exposure to IR, 73 individuals without a cancer and hematologic diseases that were affected by the Chernobyl disaster and 72 residents of Kyiv without affecting by IR in anamnesis. Determination of polymorphisms of p53-mediated apoptosis was performed by polymerase chain reaction followed by restriction.

✉ Чумак Анатолій Андрійович, e-mail: ananch@ukr.net

Results. The distribution of genotypes in patients with CLL did not differ from controls, except for reduced the frequency of homozygotes Arg/Arg *TP53* among patients with CLL ($p = 0.01$). Compared with non-irradiated CLL patients in the subgroup of patients affected by the accident, an increase in the frequency of polymorphic alleles of the gene *p21* ($p = 0.033$) was found, especially in combination with Arg alleles (genotypes Arg/Arg and Arg/Pro) of *TP53* gene and genotype TT SNP309 of *MDM2* gene ($p = 0.009$).

Conclusion. Preliminary studies indicated the likely contribution of rs1801270 polymorphism of the gene *p21* in the pathogenesis of CLL in patients who had been exposed to IR. The effects of SNPs rs1042522 of *TP53* gene and SNP309 of *MDM2* gene on the risk of CLL in the Chernobyl accident sufferers were not revealed.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, p53-mediated apoptosis, polymorphism, *TP53*, *p21*, *MDM2* genes, ionizing radiation.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:223–230.

ВСТУП

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) – найпоширеніша форма онкогематологічних захворювань дорослого населення України. Етіологія захворювання остаточно невідома. Традиційно ХЛЛ вважається нерадіогенною формою лейкемії. Підставою для такого твердження були переважно результати обстеження хворих, які отримували радіотерапевтичне лікування, та осіб, що вижили після ядерного бомбардування Хіросіми та Нагасакі [1–4]. Однак в останні роки ведуться активні дискусії щодо впливу іонізуючого випромінення (ІВ) на розвиток ХЛЛ. Так, протягом 20–30 років після опромінення виявлено ексцес смертності від ХЛЛ серед хворих на анкілозуючий спондиліт [5] та серед жінок, які отримували опромінення з приводу незлоякісних гінекологічних захворювань [6]. Результати спільного Американсько-Українського епідеміологічного проекту по дослідженню лейкемії та інших гематологічних захворювань серед учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на Чорнобильській АЕС, які ґрунтуються на обстеженні когорти 110 000 учасників ЛНА з 6 регіонів України, показали, що ХЛЛ – найбільш часта форма лейкемії серед обстеженого контингенту та її частота підвищена серед учасників ЛНА з отриманою дозою опромінення понад 100 мЗв [7].

Відомо, що вплив ІВ на клітини реалізується передусім через активацію системи p53-опосередкованого апоптозу та зупинку клітинного циклу. Поява ушкоджень ДНК при дії ІВ активує ряд кіназ, які викликають фосфорилування білка-антагоніста MDM2, що порушує зв'язування MDM2 з p53 та убіквітин-залежну деградацію p53, а також фосфорилування безпосередньо білка p53. Активованій p53 виступає як фактор транскрипції для різних генів і спрямовує клітинні процеси у напрямку зупинки клітинного циклу, або індукції апоптозу. Вибір того чи іншого шляху регулюється різною активністю p53 залежно від особливостей його фосфорилування. Фосфори-

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is one of the most common lymphoid malignancies in the Ukraine. The etiology of the disease remains so far elusive. Usually, CLL is considered to be a non-radiogenic form of leukemia. This is based mainly on the investigation of radiotherapy patients and survivors of Hiroshima and Nagasaki nuclear bombing [1–4]. But now the influence of ionizing radiation (IR) on CLL development is under active discussion. An excess of CLL mortality among ankylosing spondylitis patients who had been treated with X irradiation [5] and among female patients who had been submitted to radiotherapy for benign gynecologic disorders [6] was found in 20–30-year after irradiation. The results of the joint USA-Ukrainian epidemiological project for Study of Leukemia and Other Hematological Diseases Among Clean-up Workers at the Chernobyl Nuclear Power Plant (NPP) based on the estimation of a cohort of 110,000 clean-up workers of the Chernobyl NPP accident from 6 regions of Ukraine, have demonstrated that CLL was the most frequent form of leukemia among observed persons and revealed increased frequency of CLL among clean-up workers whose estimated dose exceeded 100 mSv [7].

It is known, that effects of IR on cells is realized in activation of the p53-dependent apoptosis and cell arrest. IR as a DNA damaging agent induces a range of DNA lesions, and their appearance induces activation of several kinases and phosphorylation of different proteins, first of all, MDM2 and p53. Phosphorylated MDM2 has reduced ability to the binding with the p53 that impairs ubiquitin-dependent degradation and stabilization of p53 protein. Activated phosphorylated p53 is transcription factor for several genes involved in cell arrest and apoptosis. The choice between cell arrest or apoptosis is regulated by transcription

лювання p53 у ділянці залишку серину-15 призводить до зупинки клітинного циклу (p53 активує експресію білка p21 – інгібітора комплексів циклін–циклін-залежні кінази), а додаткове фосфорилювання залишку серину-46 призводить до дії p53 як фактора транскрипції проапоптичних генів (*p53AIP1*) [8]. Протягом зупинки клітинного циклу відбувається репарація генетичних пошкоджень. Якщо ушкодження ДНК швидко репаруються, кінази АТМ переходять в неактивну форму, активований p53 як фактор транскрипції підвищує активність гену *MDM2*, внаслідок чого відбувається деградація p53. Якщо ушкодження ДНК не репаруються протягом відносно тривалого часу, то зберігається високою кіназна активність АТМ та споріднених кіназ, під впливом p53 підвищується транскрипція білка p53DINP1, накопичення якого в клітині зумовлює додаткове фосфорилювання p53 з індукцією розвитку апоптозу та елімінації генетично ушкоджених клітин [9].

Зважаючи на центральну роль гена *TP53* у клітинній відповіді на дію ІВ, нами висловлено припущення, що наявність деяких функціонально значущих поліморфних варіантів генів p53-опосередкованого апоптозу (*TP53*, *p21* та *MDM2*) може впливати на чутливість клітин до дії ІВ та розвиток ХЛЛ на тлі радіаційного впливу.

МЕТА

Тому метою даного дослідження було встановити значення поліморфізмів генів p53-опосередкованого апоптозу (*TP53* кодон 72 Arg/Pro, *p21* кодон 31 Ser/Arg, *MDM2* SNP309) для виникнення ХЛЛ у осіб, які зазнали впливу ІВ внаслідок Чорнобильської катастрофи.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Визначення поліморфізмів p53-опосередкованого апоптозу проведено у 320 хворих на ХЛЛ В-клітинного походження: 244 чоловіків (76,3%) і 76 жінок (23,8%) віком від 29 до 86 років на момент діагнозу (середній вік $57,59 \pm 0,53$ року, медіана 58 років). Діагноз ХЛЛ встановлювали на основі клініко-гематологічних критеріїв та імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові – виявлення типового фенотипу CD5+CD20+CD23+HLA-DR+CD22^{low}. Стадію захворювання визначали за класифікаціями Rai K.R. et al. [10, 11] та Binet J.L. et al. [12].

Основну групу (група I) становили 107 опромієних внаслідок Чорнобильської катастрофи пацієнтів (96 чоловіків і 11 жінок, середній вік $57,71 \pm 0,87$ року, медіана 57 років). Серед них 7 евакуйованих з м. Прип'ять, 16 мешканців контрольованих територій

activity of p53 that depends on the number of phosphorylated amino acid sites in p53 molecule. Serine-15 phosphorylated p53 activates expression of p21 protein, small inhibitor of cyclin–cyclin-dependent kinase complexes, that leads to cell arrest. Serine-15 and serine-46 phosphorylated p53 activates expression of pro-apoptotic genes (*p53AIP1*) [8]. DNA repair occurs during cell arrest. If DNA repairs quickly, ataxia-teleangiectasia (ATM) kinase inactivates, and p53 protein as transcription factor increases activity of *MDM2* gene, which acts as inhibitory protein for p53 and accelerates its degradation. If DNA damaged does not repaired during relatively long time, ATM and relative kinases conserve their high activity, p53 protein is phosphorylated under action of p53DINP1 and increases expression of pro-apoptotic genes. This process promotes elimination of cells with genetic lesions [9].

Bearing in mind the for central role of *TP53* gene in cellular response to IR, we put forward an assumption that some functional polymorphic variants of p53-dependent apoptosis pathway genes (*TP53*, *p21*, and *MDM2*) may influence on cell susceptibility to IR and CLL development under IR effects.

OBJECTIVE

Thus, the aim of the paper was to study significance of genes' polymorphisms involved in p53-dependent apoptosis pathway (*TP53* codon 72 Arg/Pro, *p21* codon 31 Ser/Arg, *MDM2* SNP309) for CLL development in sufferers of Chernobyl NPP accident.

MATERIALS AND METHODS

The polymorphisms of p53-dependent apoptosis pathway genes were studied in 320 CLL patients: 242 males (76.3 %) and 76 females (23.8 %) at the age of 29–86 years (mean age 57.59 ± 0.53 years, median age 58 years). CLL was diagnosed on the basis of clinical history, lymphocyte morphology, and immunophenotypic criteria (detection of typical phenotype CD5+CD20+CD23+HLA-DR+CD22^{low}). The stage of the disease was assessed by Binet or Rai classification [10–12].

The main group (group I) consisted of 107 IR-exposed CLL patients (96 males and 11 females; mean age 57.7 ± 0.87 years, median age of 57 years). It included 7 evacuees from Prypiyat, 16 inhabitants of radionuclide-contaminated areas,

рій, забруднених радіонуклідами, 84 учасники ЛНА на ЧАЕС, серед яких 72 брали участь в ЛНА в 1986 р., 5 – в 1987 р. і 7 – в 1988-1989 рр. Дози опромінення за даними офіційних документів були відомі у 39 хворих на ХЛЛ основної групи і становили в середньому для учасників ЛНА 1986 р. ($n = 22$) $31,76 \pm 7,23$ сЗв; учасників ЛНА 1987 р. ($n = 3$) – $7,57 \pm 2,22$ сЗв; учасників ЛНА 1988–1989 рр. ($n = 4$) – $4,34 \pm 0,51$ сЗв; мешканців радіаційно забруднених територій ($n = 6$) – $1,13 \pm 0,26$ сЗв і евакуйованих ($n = 4$) – $4,76 \pm 0,35$ сЗв.

Хворі на ХЛЛ ($n = 213$), які не мали в анамнезі впливу ІВ, становили групу порівняння (група II). До її складу входило 148 чоловіків (69,5%) та 65 жінок (30,5%), середній вік $57,52 \pm 0,65$ року, медіана 58 років.

Хворі основної групи та групи порівняння співпадали за віком ($p = 0,956$) та стадією на момент встановлення діагнозу ($p = 0,169$ при порівнянні за Rai, та $p = 0,390$ – за Binet класифікацією).

Контрольна група (група III) складалась з 73 осіб без наявності онкологічних та онкогематологічних захворювань, які постраждали внаслідок Чорнобильської катастрофи (підгрупа IIIa) та 72 мешканців м. Києва без впливу ІВ в анамнезі (підгрупа IIIб). Радіаційний анамнез осіб контрольної підгрупи IIIa був наступним: 62 учасники ЛНА, 8 осіб, які перенесли гостру променевою хворобу, 3 евакуйованих з м. Прип'ять. Дози опромінення були відомі у 46 учасників ЛНА, вони коливались у межах від 0,1 до 95 сЗв і співпадали в середньому ($24,08 \pm 3,43$ сЗв) з дозами, отриманими хворими на ХЛЛ учасниками ЛНА основної групи ($p > 0,05$).

Визначення поліморфізмів p53-опосередкованого апоптозу проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією.

Проводилось визначення наступних поліморфізмів:

- > rs1042522 гена *TP53*, що локалізований у кодоні 72 (нуклеотидна заміна G>C) і призводить до наявності у складі молекули або залишку аргініну (p53Arg, генотип CGC), або проліну (p53Pro; генотип CCC). 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 [13];
- > rs2279744 гена *MDM2*, що розташований в ділянці P2 промотора і проявляється як нуклеотидна заміна G>T. Відомо, що в присутності алелі G підвищується експресія білка MDM2, що призводить до зниження проапоптотичних властивостей клітин [14];
- > rs1801270 у 31-му кодоні гена *p21*, який призводить до заміни цитозину на аденін у нуклеотидній послі-

and 84 clean-up workers. Among clean-up workers, 72 were clean-up workers of 1986 (estimated doses were available for 22 persons, mean dose 31.76 ± 7.23 cSv), 5 were clean-up workers of 1987 (estimated doses were available for 3 patients, mean dose 7.57 ± 2.22 cSv), and 7 were clean-up workers of 1988–1989 (estimated doses were available for 4 patients, mean dose 4.34 ± 0.51 cSv). There were 4 evacuees from Prypiyat (mean dose 4.76 ± 0.35 cSv) among the study subjects.

The comparison group (group II) included 213 CLL patients not exposed to impact of IR: 148 males (69.5 %) and 65 females (30.5 %) with a mean age 57.52 ± 0.65 years, median age of 58 years.

Patients of the two groups were comparable by age ($p = 0.956$) and stage at diagnosis ($p = 0.169$ according Rai classification, and $p = 0.390$ according Binet classification).

The control group (group III) consisted of 145 patients without oncological and oncohematological diseases: 73 sufferers of Chernobyl NPP accident (subgroup IIIa) and 72 IR non-exposed inhabitants of Kyiv (subgroup IIIb). Subgroup IIIa included 62 clean-up workers, 8 acute radiation syndrome convalescents, and 3 evacuees from Prypiyat. Estimated doses were available for 46 clean-up workers ($0.1-95$ cSv, mean dose 24.08 ± 3.43 cSv), that was comparable with doses of clean-up workers from group I ($p > 0.05$).

Genes' polymorphisms of p53-dependent apoptosis pathway were assayed using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

Polymorphisms that were determined included:

- > a single nucleotide polymorphism (SNP) rs1042522 in codon 72 of *TP53* gene (G>C) encoding either arginine (p53Arg, genotype CGC) or proline (p53Pro, genotype CCC). The Arg variant is more effective at inducing apoptosis than the Pro, while the Pro/Pro genotype was associated with an increased expression of cell arrest genes [13];
- > rs2279744 in P2 promotor of *MDM2* gene and evident as a nucleotide exchange (G>T). It was shown that the G allele was associated with high expression of MDM2 protein and impaired apoptosis induction [14];
- > rs1801270 in codon 31 of *p21* gene (leads to C>A exchange) encoding either serine or argi-

довності, а у складі білка – до амінокислотної заміни серину на аргінін (Ser>Arg). Поліморфізм rs1801270 впливає на ефективність транскрипції білка p21 – експресія нижча за умов носійства Ser алелі [15].

Отримані результати оброблялися за допомогою методів варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ

Розподіл генотипів rs1042522 гена TP53, rs2279744 гена MDM2 та rs1801270 гена p21 в усіх групах обстежених осіб підпорядковувався закону Харді-Вайнберга. Отримані дані в контрольній групі співпадали з результатами обстеження інших груп кавказоїдів [13–15].

Дози опромінення, які отримали хворі на ХЛЛ основної групи, не розрізнялись у носіїв різних генотипів генів p53-опосередкованого апоптозу (аналіз проводився окремо за категоріями хворих: мешканці контрольованих територій, учасники ЛНА, евакуйовані).

Розбіжностей в розподілі окремих генотипів між хворими на ХЛЛ та контролем не виявлено (табл.1), за винятком зменшення частоти гомозигот Arg/Arg TP53 серед хворих на ХЛЛ ($p = 0,01$). Це стосувалось насамперед хворих основної групи ($p = 0,073$ при порівнянні з відповідним контролем). Враховуючи, що за генотипу Arg/Arg здатність клітин до розвитку апоптозу вища, ніж за наявності інших генотипів rs1042522 гена TP53, ці дані перебувають у відповідності з концепцією патогенезу ХЛЛ, в якій значна увага приділяється зниженню чутливості лейкемічних клітин до дії про-апоптотичних стимулів [16].

В основній групі хворих, які зазнали впливу ІВ внаслідок аварії на ЧАЕС, була вдвічі підвищена частота поліморфної алелі гена p21 порівняно з неопроміненими хворими на ХЛЛ. Розбіжності між групами були вірогідні: $p = 0,033$ при порівнянні носіїв поліморфної алелі (генотипи Arg/Ser+Arg/Arg) проти генотипу Ser/Ser. Водночас розбіжності порівняно з опроміненим контролем не набули статистичної значущості ($p = 0,161$). Інших розбіжностей в розподілі генотипів між хворими на ХЛЛ залежно від впливу ІВ не виявлено.

Сумісний аналіз всіх трьох поліморфізмів p53-опосередкованого апоптозу був проведений у 271 хворого на ХЛЛ (табл.2). В основній групі виявлено збільшення частоти гаплотипу Arg/Pro rs1042522 гена TP53/TT, SNP309 гена MDM2/Arg/Ser, rs1801270 гена p21 (4,8% в основній групі проти 0,6% в групі порівняння; $p = 0,022$), а також частоти генотипу Arg/Ser гена p21 в комбінації з алеллю

nine (Ser>Arg) was recently shown to be functionally relevant for p21 protein transcription (decreased expression in carriers of Ser allele) [15].

Statistics were performed using the SPSS 16.0 software package (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Genotype frequencies in all groups did not differ significantly from those predicted by Hardy-Weinberg equilibrium. These rates are comparable to those found in other Caucasian populations [13–15].

In IR-exposed CLL patients of the main group, doses of irradiation did not differ for carriers of different genotypes of p53-dependent pathway (analysis was performed for different categories of patients separately: inhabitants of radionuclide-contaminated areas, clean-up workers, and evacuees).

We did not find any difference in the distribution of certain genotypes between CLL patients and controls, except for the a decreased frequency of the common homozygous Arg/Arg TP53 genotype in CLL patients compared with controls ($p = 0.01$) (Table 1). This applies primarily to the CLL patients of the main group ($p = 0.073$ in comparison with IR-exposed controls). Given that Arg/Arg genotype is more effective at inducing apoptosis comparing with the others rs1042522 TP53 genotypes, these data are in agreement with the concept of CLL pathogenesis, where attention is paid to an impaired cell sensitivity to apoptotic stimuli [16].

In the main group of IR-exposed CLL patients, the frequency of p21 gene polymorphic allele was doubled vs. IR non-exposed CLL patients. Differences between two groups of CLL patients were significant in comparison Ser/Ser genotype vs. Arg/Ser+Arg/Arg genotypes ($p = 0.033$), but differences between IR-exposed CLL patients and IR-exposed controls did not reach significance ($p = 0.161$). We did not find any others differences in the distribution of studied polymorphisms between CLL patients depending on IR exposure.

Joined analysis of all studied polymorphisms of p53-dependend apoptosis was performed in 272 CLL patients (Table 2). The increased frequency of haplotype Arg/Pro rs1042522 of TP53/TT, SNP309 of MDM2/Arg/Ser, rs1801270 p21 was found (4.8 % and 0.6 % in both groups correspondingly; $p = 0.022$) as well as increased frequency of Arg/Ser p21 genotype in combination

Таблиця 1

Розподіл генотипів rs1042522 гена *TP53*, rs2279744 гена *MDM2* та rs1801270 гена *p21* серед обстежених хворих на ХЛЛ та в контролі

Table 1

The distribution of rs1042522 *TP53*, rs2279744 *MDM2*, and rs1801270 *p21* genotypes among CLL patients and the controls

Групи обстежених осіб	Кількість обстежених (%) з генотипами генів за поліморфізмами, що досліджувались			P
Groups of observed patients	Number of persons (%) with genotypes of			
Генотипи гена <i>TP53</i> / <i>TP53</i> gene				
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	
хворі на ХЛЛ / all CLL patients, n = 294	145 (49,3)	117 (39,8)	32 (10,9)	0,07
група III / group III, n = 145	87 (60,0)	49 (33,8)	9 (6,2)	
група I / group I, n = 107	50 (46,7)	47 (43,9)	10 (9,3)	0,212
підгрупа IIIa / subgroup IIIa, n = 73	44 (60,3)	24 (32,9)	5 (6,8)	
група II / group II, n = 187	95 (50,8)	70 (37,4)	22 (11,8)	0,243
підгрупа IIIb / subgroup IIIb, n = 72	43 (59,7)	25 (34,7)	4 (5,5)	
Генотипи гена <i>MDM2</i> / <i>MDM2</i> gene				
	TT	TG	GG	
хворі на ХЛЛ / all CLL patients, n = 303	145 (47,9)	129 (42,6)	29 (9,6)	0,624
група III / group III, n = 145	62 (42,7)	66 (45,1)	17 (12,2)	
група I / group I, n = 107	47 (43,9)	48 (44,9)	12 (11,2)	0,976
підгрупа IIIa / subgroup IIIa, n = 73	32 (43,8)	32 (43,8)	9 (12,4)	
група II / group II, n = 196	98 (50,0)	81 (41,3)	17 (8,7)	0,440
підгрупа IIIb / subgroup IIIb, n = 72	30 (41,7)	34 (47,2)	8 (11,1)	
Генотипи гена <i>p21</i> / <i>p21</i> gene				
	Ser/Ser	Arg/Ser	Arg/Arg	
хворі на ХЛЛ, n = 287	241 (84,0)	44 (15,3)	2 (0,7)	0,543
група III / group III, n = 144	126 (87,5)	18 (12,5)	0	
група I / group I, n = 104	81 (77,9)	22 (21,2)	1 (1,0)	0,271
підгрупа IIIa / subgroup IIIa, n = 72	62 (86,1)	10 (13,9)	0	
група II / group II, n = 183	160 (87,4)	22 (12,0)	1 (0,5)	1,0
підгрупа IIIb / subgroup IIIb, n = 72	64 (88,9)	8 (11,1)	0	

Arg (генотипи Arg/Arg і Arg/Pro) гена *TP53* і генотипом TT гена *MDM2* (9,6% та 2,4%, відповідно; p = 0,009).

Враховуючи вплив вказаних поліморфізмів на функцію відповідних білків, можна припустити, що за гаплотипу Arg/Pro *TP53*/TT *MDM2*/Arg/Ser *p21* негативний вплив білка-антагоніста *MDM2* на білок p53 є мінімальним (експресія *MDM2* найвища за умов G алелі), однак зупинка клітинного циклу може бути порушена внаслідок зниження експресії гена *p21* у носіїв Ser алелі. Це, в свою чергу, може призводити до неадекватної репарації пошкоджень ДНК при дії ІВ.

ВИСНОВОК

Проведені попередні дослідження свідчать про вірогідний внесок поліморфізму rs1801270 гена *p21* в патогенез ХЛЛ у осіб, які зазнали впливу ІВ. Впливу поліморфізмів rs1042522 гена *TP53* та SNP309 гена

with Arg allele (Arg/Arg+Arg/Pro genotypes) of *TP53* and TT of *MDM2* genotype (9.6 % and 2.4 % respectively; p = 0.009).

Taking into account functional relevance of studied polymorphisms for apoptosis induction, it can be assumed that the negative influence of *MDM2* protein on p53 protein is minimal in carriers of haplotype Arg/Pro *TP53*/TT *MDM2*/Arg/Ser *p21* (due to the highest expression of *MDM2* in carriers of G allele), but cell cycle arrest may be compromised due to decreased expression of *p21* in carriers of Ser allele. It may be reason for uncorrected DNA repair under IR action.

CONCLUSION

These preliminary findings suggest to possible impact of rs1801270 *p21* polymorphism in pathogenesis of CLL in IR-exposed persons. The impact of rs1042522 *TP53* and SNP309 *MDM2* in CLL

Таблиця 2

Розподіл гаплотипів генів p53-опосередкованого апоптозу у хворих на ХЛЛ

Table 2

The distribution of haplotypes of p53-dependent apoptosis pathway genes among CLL patients

Генотипи SNP309 гена MDM2 SNP309 of MDM2 genotypes	Кількість обстежених (%) з генотипами rs1801270 гена p21			Кількість обстежених (%) з генотипами rs1801270 гена p21		
	Number of persons (%) with rs1801270 of p21 genotypes in			Number of persons (%) with rs1801270 of p21 genotypes in		
	основна група / group I			група порівняння / group II		
	Ser/Ser	Arg/Ser	Arg/Arg	Ser/Ser	Arg/Ser	Arg/Arg
Генотип Arg/Arg rs1042522 гена TP53 // Arg/Arg rs1042522 TP53 genotype						
TT	17 (16,3)	5 (4,8)	0	38 (22,8)	3 (1,8)	0
TG	16 (15,4)	5 (4,8)	1 (1,0)	31 (18,5)	7 (4,2)	0
GG	3 (2,9)	0	0	5 (3,0)	1 (0,6)	0
Генотип Arg/Pro rs1042522 гена TP53 // Arg/Pro rs1042522 TP53 genotype						
TT	15 (14,4)	5 (4,8)	0	32 (19,2)	1 (0,6)	0
TG	16 (15,4)	5 (4,8)	0	17 (10,2)	5 (3,0)	0
GG	5 (4,8)	1 (1,0)	0	4 (2,4)	1 (0,6)	0
Генотип Pro/Pro rs1042522 гена TP53 // Pro/Pro rs1042522 TP53 genotype						
TT	4 (3,8)	0	0	11 (6,6)	0	0
TG	4 (3,8)	0	0	6 (3,6)	0	1 (0,6)
GG	1 (1,0)	1 (1,0)	0	3 (1,8)	1 (0,6)	0
Загалом / total	104 (100)	167 (100)				

MDM2 на ризик розвитку ХЛЛ у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС не виявлено.

Подяка

Дослідження проведені за планом Національної академії медичних наук України (НДР № 536, номер державної реєстрації 0113U002327). Автори вдячні президенту благодійної організації “KIHEV Kinderhilfe Kiew e.V.” Т. Хармсу за підтримку в придбанні реагентів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Finch S. C. Chronic lymphocytic leukemia in Hiroshima and Nagasaki, Japan / S. C. Finch, T. Hoshito, T. Itoga [et al.] // Blood. – 1969. – Vol. 33, No. 1. – P. 79–86.
2. Preston D. L. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987 / D. L. Preston, S. Kusumi, M. Tomonege [et al.] // Radiat. Res. – 1994. – Vol. 137, Suppl. 2. – P. 68–97.
3. Court-Brown W. Mortality from cancer and other causes after radiotherapy for ankylosing spondylitis / W. Court-Brown, R. Doll // Br. Med. J. – 1965. – Vol. 2. – P. 1327–1332.
4. Darby S. C. Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis / S. C. Darby, R. Doll, S. K. Gill, P. G. Smith // Br. J. Cancer. – 1987. – Vol. 55, No. 2. – P. 179–190.

development in sufferers of Chernobyl NPP did not revealed.

Acknowledgements

This study is supported by the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (grant No. 536, state registration No. 0113U002327). The authors are grateful to the President of the charitable organization “KIHEV Kinderhilfe Kiew e.V.” T. Harms for support in the acquisition of reagents.

REFERENCES

1. Finch SC, Hoshino T, Itoga T, Ichimaru M, Ingram RH Jr. Chronic lymphocytic leukemia in Hiroshima and Nagasaki, Japan. Blood. 1969 Jan;33(1):79-86.
2. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. Radiat Res. 1994 Feb;137(2 Suppl):S68-97.
3. Court-Brown WM, Doll R. Mortality from cancer and other causes after radiotherapy for ankylosing spondylitis. Br Med J. 1965 Dec 4;2(5474):1327-32.
4. Darby SC, Doll R, Gill SK, Smith PG. Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis. Br J Cancer. 1987 Feb;55(2): 179-90.

5. Weiss H. A. Cancer mortality following X-rays treatment for ankylosing spondylitis / H. A. Weiss, S. C. Darby, R. Doll // *Int. J. Cancer.* – 1994. – Vol. 59. – P. 327–338.
6. Inskip P. D. Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvis radiotherapy for benign disease / P. D. Inskip, R. A. Kleinerman, M. Stovall [et al.] // *Radiat. Res.* – 1993. – Vol. 135. – P. 108–124.
7. Romanenko A. Y. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks / A. Y. Romanenko, S. C. Finch, M. Hatch [et al.] // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170, No. 6. – P. 711–720.
8. Cheng Q. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage / Q. Cheng, J. Chen // *Cell Cycle.* – 2010. – Vol. 9, No. 3. – P. 472–478.
9. Baptiste-Okoh N. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis / N. Baptiste-Okoh, A. M. Barsotti, C. Prives // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, No. 6. – P. 1937–1942.
10. Rai K. R. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia / K. R. Rai, A. Sawitzky, E. P. Cronkite [et al.] // *Blood.* – 1975. – Vol. 46, No. 2. – P. 219–234.
11. 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.
12. Binet J. L. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / J. L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero [et al.] // *Cancer.* – 1981. – Vol. 48, No. 1. – P. 198–205.
13. Sullivan A. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo / A. Sullivan, N. Syed, M. Gasco [et al.] // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23. – P. 3328–3337.
14. Bond G. L. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect / G. L. Bond, W. Hu, A. Levine // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 5481–5484.
15. Wang N. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women / N. Wang, S. Wang, Q. Zhang [et al.] // *BMC Cancer.* – 2012. – Vol. 12. – P. 589–593.
16. Fegan C. Apoptosis deregulation in CLL / C. Fegan, C. Pepper // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2013. – Vol. 792. – P. 151–171.
5. Weiss HA, Darby SC, Doll R. Cancer mortality following X-rays treatment for ankylosing spondylitis. *Int J Cancer.* 1994 Nov 1;59(3):327-38.
6. Inskip PD, Kleinerman RA, Stovall M, Cookfair DL, Hadjimichael O, Moloney WC, et al. Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvis radiotherapy for benign disease. *Radiat Res.* 1993 Jul;135(1):108-24.
7. Romanenko AY, Finch SC, Hatch M, Lubin JH, Bebesko VG, Bazyka DA, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chornobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation. *Radiat Res.* 2008 Dec;170(6):711-20. doi: 10.1667/RR1404.1.
8. Cheng Q, Chen J. Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle.* 2010;9(3):472-8.
9. Baptiste-Okoh N, Barsotti AM, Prives C. A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(6):1937-42.
10. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975 Aug;46(2):219-34.
11. Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. Chronic lymphocytic leukemia. Recent progress and future direction. New York: Alan R Liss; 1987. 253 pp.
12. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 1981 Jul 1;48(1):198-206.
13. Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, Hiller L, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene.* 2004 Apr 22;23(19):3328-37.
14. Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5481-4.
15. Wang N, Wang S, Zhang Q, Lu Y, Wei H, Li W, et al. Association of p21 SNPs and risk of cervical cancer among Chinese women. *BMC Cancer.* 2012 Dec 11;12:589.
16. Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol.* 2013;792:151-71.

Стаття надійшла до редакції 9.07.2014

Received: 9.07.2014