

УДК: 616.98[578.825-616.155.392]:614.876

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», 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

РОЗПОДІЛ ГЕНОТИПІВ ЗА ПОЛІМОРФІЗМОМ rs2124594 У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ З УРАХУВАННЯМ РАДІАЦІЙНОГО АНАМНЕЗУ

Мета роботи: апробувати метод полімеразної ланцюгової реакції з наступним рестрикційним аналізом для визначення rs2124594 і подальшого дослідження внеску у розвиток хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ) в післячорнобильський період.

Методи. Визначення генотипів за поліморфізмом rs2124594 проведено у 109 хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ) В-клітинного походження, в тому числі 53 опромінені внаслідок Чорнобильської катастрофи. Розподіл генотипів у хворих на ХЛЛ порівняний з групою практично здорових осіб європейського походження (дані 1000 Genomes Project).

Результати. Валідність апробованого методу підтверджена прямим секвенуванням. Встановлено підвищення ризику розвитку ХЛЛ за носійства поліморфної алелі С (OR = 2,37; 95 % CI 1,50–3,73; p = 0,003) та генотипу СТ (OR = 2,10; 95 % CI 1,38–3,21; p = 0,0012). Розподіл генотипів серед опроміненних і неопроміненних хворих на ХЛЛ не розрізнявся.

Висновки. Підтверджена асоціація поліморфних варіантів у ділянках 127180736 і 127183014 хромосоми 8q24 поблизу гена *c-MYC* з ризиком розвитку ХЛЛ. Модифікуючого внеску іонізуючого випромінювання на реалізацію генетичної схильності до ХЛЛ, обумовленої поліморфними варіантами rs2124594, в даному пілотному дослідженні не виявлено.

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, rs2124594, іонізуюче випромінювання, аварія на Чорнобильській АЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2017. Вип. 22. С. 323–331.

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

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

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Melnykova str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Distribution of rs2124594 genotypes in chronic lymphocytic leukemia patients depending on radiation anamnesis

Objective: to test the method of polymerase chain reaction with following fragments' length restriction to determine the rs2124594 polymorphism and to study its contribution in the development of chronic lymphocytic leukemia (CLL) in the post-Chornobyl period.

Methods. Genotypes of rs2124594 were determined in 109 patients with CLL of B-cell origin including 53 patients irradiated due to the Chornobyl NPP accident. Genotypes distribution among CLL patients was compared with healthy persons of European origin (the 1000 Genomes Project data set was used as a reference).

Results. Validity of the tested method was confirmed by direct sequencing. Associations between CLL risks and C allele (OR = 2.37; 95 % CI 1.50–3.73; p = 0.003), CLL risks and CT genotype (OR = 2.10; 95 % CI 1.38–3.21; p = 0.0012) were found. Distributions of rs2124594 genotypes in exposed and non-exposed to ionizing radiation CLL patients did not differ.

Conclusions. The association of single nucleotide polymorphisms across the 8q24 chromosome region (positioned at 127180736 and 127183014 near *c-MYC* gene) with CLL risks was confirmed. Modified influence of ionizing radiation on genetic susceptibility associated with rs2124594 was not found in this pilot study.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, rs2124594, ionizing radiation, Chornobyl NPP accident.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2017;22:323–331.

ВСТУП

Схильність до розвитку хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ) має генетичне підґрунтя. Епідеміологічне дослідження даних Шведського сімейного канцерреєстру виявило восьмикратне підвищення ризику розвитку хронічної лімфоцитарної у найближчих родичів [1]. Результати повномасштабного дослідження геному дозволили ідентифікувати ряд локусів, асоційованих зі схильністю до ХЛЛ [2–5]. Одним з них є поліморфізм rs2456449, розташований в некодуючій ділянці хромосоми 8q24 поблизу локалізації гена *c-MYC* (позиція 127180736) [2, 3].

В європейській популяції за даними обстеження 503 практично здорових осіб в рамках 1000 Genomes Project розподіл генотипів за rs2456449 наступний: AA генотип 47,1 %; AG генотип 43,3 %; GG генотип 9,5 %, частота алелі А 0,69, G алелі – 0,31 [6]. У хворих на ХЛЛ виявлено зниження частоти генотипу AA (31,3 % проти 40,8 % у контролі) при відповідному підвищенні відносної кількості генотипів AG (52,9 % проти 46,7 %) та GG (15,8 % проти 12,5 %) і G алелі (0,42), що обумовлює зростання ризику розвитку ХЛЛ за умов носійства G алеля [3].

Функціональне значення rs2456449 невідомо. Висловлено припущення, що він модулює зв'язування фактору транскрипції IRF4 (interferon regulatory fac-

INTRODUCTION

There is a genetic basis of the predisposition to chronic lymphocytic leukemia (CLL). Results from the Swedish Family-Cancer Database showed the eightfold increase of risk of CLL development in the nearest relatives of the patients [1]. Results of a genome-wide study of CLL provided the identification of several risk loci associated with predisposition to the CLL development [2–5]. One of them is rs2456449, localizes in non-coding region of 8q24 chromosome near *c-MYC* gene (position 127180736 bp) [2, 3].

According to the data of 1000 Genomes Project based on the analysis of 503 healthy Europeans the distribution of rs2456449 genotypes was as follows: 47.1 % AA genotype; 43.3 % AG genotype; 9.5 % GG genotype, the frequency of A allele was 0.69, and the frequency of G allele was 0.31 [6]. Comparing to healthy controls, in CLL patients a lower frequency of AA genotype (31.3 % vs 40.8 %) and a corresponding higher frequencies of AG genotype (52.9 % vs 46.7 %), GG genotype (15.8 % vs 12.5 %) and G allele (0.42) were found proving for elevated risks of CLL in carriers of G allele [3].

The functional value of rs2456449 is unknown. It was conjectured that it modulates the binding of transcription factor IRF4 (interferon regula-

tor 4; інтерферон-регуляторний фактор 4) з геном *c-MYC* і таким чином впливає на рівень експресії останнього. Це було встановлено при дослідженні клітин анапластичної крупноклітинної Т-лімфоми методом імунопреципітації хроматину: пригнічення IRF4 за допомогою анти-смыслових РНК призводить до різкого зниження концентрації білка *c-MYC* [7]. IRF4 задіяний в процес диференціювання В-лімфоцитів та його поліморфні варіанти (rs872071) також асоційовані з ризиком розвитку ХЛЛ [8, 9].

Визначення rs2456449 потребує прямого секвенування геному. Поліморфізм rs2456449 (позиція 127183014 в ділянці хромосоми 8q24) перебуває у не-випадковій асоціації (зчепленні) з декількома іншими поліморфізмами, розташованими в тій же ділянці хромосоми 8q24. Одним з них є rs2124594, розподіл генотипів якого практично повністю співпадає з розподілом за поліморфізмом rs2456449 в усіх групах обстежених осіб (коефіцієнт кореляції 1,0). Так, в європейській популяції (за даними 1000 Genomes Project) гаплотипи rs2456449/rs2124594 були наступними: AA/TT – 237 осіб; AG/CT – 217 осіб; GG/CC – 48 осіб; і тільки в одному випадку з 503 проаналізованих виявлено гаплотип AG/TT, тобто, відмінність за одною із 1006 алелей. На відміну від rs2456449, поліморфізм rs2124594 (agtaacaaaacagcatg-gtactgg[C/T]accaaaacagatatagaccaatg) містить сайт рестрикції, тому його визначення є можливим за допомогою більш доступного методу рестрикційного аналізу.

Відомо, що генетична схильність організму до розвитку патологічних процесів реалізується за умов дії певних негативних чинників навколишнього середовища [10, 11].

МЕТА РОБОТИ

Враховуючи суттєвий вплив іонізуючого випромінювання на реалізацію онкологічної і онкогематологічної патології населення України після аварії на Чорнобильській АЕС [12–14], метою даної роботи було: апробувати метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним рестрикційним аналізом для визначення rs2124594 і подальшого дослідження внеску у розвиток ХЛЛ в післячорнобильській період.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено у 109 хворого на ХЛЛ В-клітинного походження: 87 чоловіків (79,8 %) і 23 жінок (20,2 %) віком від 33 до 74 років на момент діагнозу (середній вік $(58,83 \pm 0,95)$ років).

tory factor 4) with gene *c-MYC* and thus influences the expression level of the latter. It was found in the study of cell's lines of anaplastic large cell lymphoma by chromatin immunoprecipitation method: IRF4 silencing by anti-sense RNAs resulted in MYC protein downregulation [7]. IRF4 is involved in the process of B lymphocytes differentiation and their polymorphic variants (rs872071) associated with CLL risk also [8, 9].

The detection of rs2456449 is performed by direct DNA sequencing. Polymorphic variant rs2456449 (position 127,183,014 bp of 8q24) is in disequilibrium linkage with some others polymorphisms of the same part of 8q24. One of them is rs2124594. The distribution of rs2124594 genotypes fully corresponds to the distribution of rs2456449 in all observed populations ($r = 1.0$). For example, among healthy Europeans (according to the data of 1000 Genomes Project) haplotypes rs2456449/rs2124594 were as follows: AA/TT – 237 persons; AG/CT – 217 persons; GG/CC – 48 persons. Discordant haplotype AG/TT was revealed in only one of 503 analyzed cases, which means the difference of only one from 1,006 alleles. Unlike to rs2456449, nucleotide sequence of rs2124594 (agtaacaaaacagcatg-gtactgg[C/T]accaaaacagatatagaccaatg) contains a site of restriction. Therefore, it is possible to use restriction fragment length polymorphism analysis to its detection.

It is known that genetic predisposition for development of diseases is realized under the influence of certain negative environmental factors [10, 11].

OBJECTIVE

Considering the significant impact of ionizing radiation (IR) on realization oncological and oncohematological pathology in post-Chornobyl period among the population of Ukraine [12–14], the objective of this work was: to test the method of restriction fragment length polymorphism to determine the rs2124594 and to study its contribution in the development of CLL in the post-Chornobyl period.

MATERIALS AND METHODS

The distribution of rs2124594 was studied in 109 CLL patients: 87 males (79.8 %) and 23 females (20.2 %) at the age of 33–74 years (mean age (58.83 ± 0.95) years).

Частина пацієнтів ($n = 53$) зазнала впливу іонізуючого випромінювання внаслідок Чорнобильської катастрофи. Серед них: 3 евакуйованих з м. Прип'ять, 8 мешканців контрольованих територій, забруднених радіонуклідами, 42 учасники ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС (33 брали участь в ЛНА в 1986 р., 9 – в 1987–1989 рр.).

Дози опромінення, за даними офіційних документів, становили в середньому для учасників ЛНА 1986 р. ($38,23 \pm 10,36$) сЗв ($n = 17$) і учасників ЛНА 1987–1989 рр. – ($4,16 \pm 0,44$) сЗв ($n = 6$). Накопичені дози (з 1986 року до діагнозу ХЛЛ) у 6 мешканців радіаційно забруднених територій (середня доза ($1,21 \pm 0,39$) сЗв) розраховувались за показниками щільності забруднення ^{137}Cs . Абсорбовані дози 3 евакуйованих з м. Прип'ять (середня доза ($5,06 \pm 0,16$) сЗв) були реконструйовані з урахуванням дати та маршруту евакуації, дати виїзду із забруднених територій та прийому препаратів йоду.

Порівняння розподілу генотипів проводили з групою практично здорових осіб європейської популяції ($n = 503$), представленою в 1000 Genomes Project Dataset [4].

Геномну ДНК для проведення молекулярних досліджень отримували з мононуклеарів периферичної крові з використанням набору QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Велика Британія) згідно з інструкцією виробника.

Для детекції rs2124594 були розроблені оригінальні праймери:

> прямий: 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' та

> зворотний: 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'.

Ампліфікацію проводили з 50 нг ДНК в ПЛР суміші загальним об'ємом 25 мкл, що включала 200 нМ кожного праймера і суміш для ампліфікації PCR Master Mix (Fermentas). Режим ампліфікації був наступним: ініціація – 94 °C, 3 хв, потім 35 циклів ампліфікації (94 °C – 30 сек, 62 °C – 30 сек, 72 °C – 40 сек). Використовувався термоциклер Bio-Rad C1000 Touch.

Рестрикцію продуктів ПЛР проводили з використанням рестриктази KpnI (FastDigest KpnI, Thermo Scientific) згідно з рекомендаціями виробника. При ПЛР ампліфікації утворювався продукт із 772 пар нуклеотидів (п.н.), який у випадку алелі Т мав сайт рестрикції для рестриктази KpnI, тоді як у випадку алеля С сайт рестрикції був відсутній. Оцінку продуктів рестрикції проводили за допомогою електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі. За носійства генотипу ТТ утворювались 2 смуги розрізаного продукту ПЛР реакції – 292 п. н. та 480 п. н.

Some patients ($n = 53$) were IR-exposed due to Chernobyl NPP accident. This subgroup included 3 evacuees from Prypiyat, 8 inhabitants of radionuclide-contaminated areas, and 42 accident clean-up workers (ACUW) (33 of them were clean-up workers of 1986, and 9 were clean-up workers of 1987–1989).

Doses of irradiation of ACUW according to the public documents were in average 38.23 ± 10.36 cSv for ACUW of 1986 ($n = 17$) and (4.16 ± 0.44) for ACUW of 1987–1989 ($n = 6$). Accumulated doses (since 1986 to the diagnosis of CLL) in 6 residents of contaminated areas (mean dose 1.21 ± 0.39) were calculated based on ^{137}Cs soil contamination density. Absorbed doses for the 3 evacuees from Prypiyat (mean dose 5.06 ± 0.16 cSv) were reconstructed taking into account date and route of evacuation, date of removal from contaminated territory, and the administration of iodine as a precautionary measure.

The comparison of rs2124594 genotype frequencies in CLL patients was performed with those for individuals of European population ($n = 503$) retrieved from the 1000 Genomes Project Dataset [4].

Genomic DNA for molecular analysis was extracted from peripheral blood mononuclear cells using the QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol.

Original primers were designed for the rs2124594 detection:

> forward: 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3' and

> reverse: 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGATGAC-3'.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in total volume 25 mL with 50 ng DNA, 200 nM of each primer and PCR Master Mix (Fermentas) on thermocycler Bio-Rad C1000 Touch. Amplification regime was as followed: initiation – 94 °C, 3 min. and then 35 cycles (94 °C – 30 sec., 62 °C – 30 sec., 72 °C – 40 sec.).

Aliquots of 5 μL PCR product were subjected to restriction endonuclease digestion for genotyping using the restriction enzyme KpnI (FastDigest KpnI, Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. PCR product was 772 bp and had restriction site for KpnI in case of T allele (restriction site was absent in case of C allele). Results of reaction were evaluated in 1.5 % agarose gel. Two lines of restricted PCR product (292 bp and 480 bp) manifested TT genotype. Only one

За носійства генотипу CC спостерігалась одна смуга нерозрізаного продукту ампліфікації – 772 п. н. Гетерозиготний варіант (генотип СТ) проявлявся утворенням трьох смуг – 292 п. н., 480 п.н. та 772 п. н. (рис. 1).

line of non-restricted PCR product (772 bp) was detected in case of CC genotype. Heterozygous CT genotype was visible as three lines (292 bp, 480 bp, and 772 bp) (Fig.1).

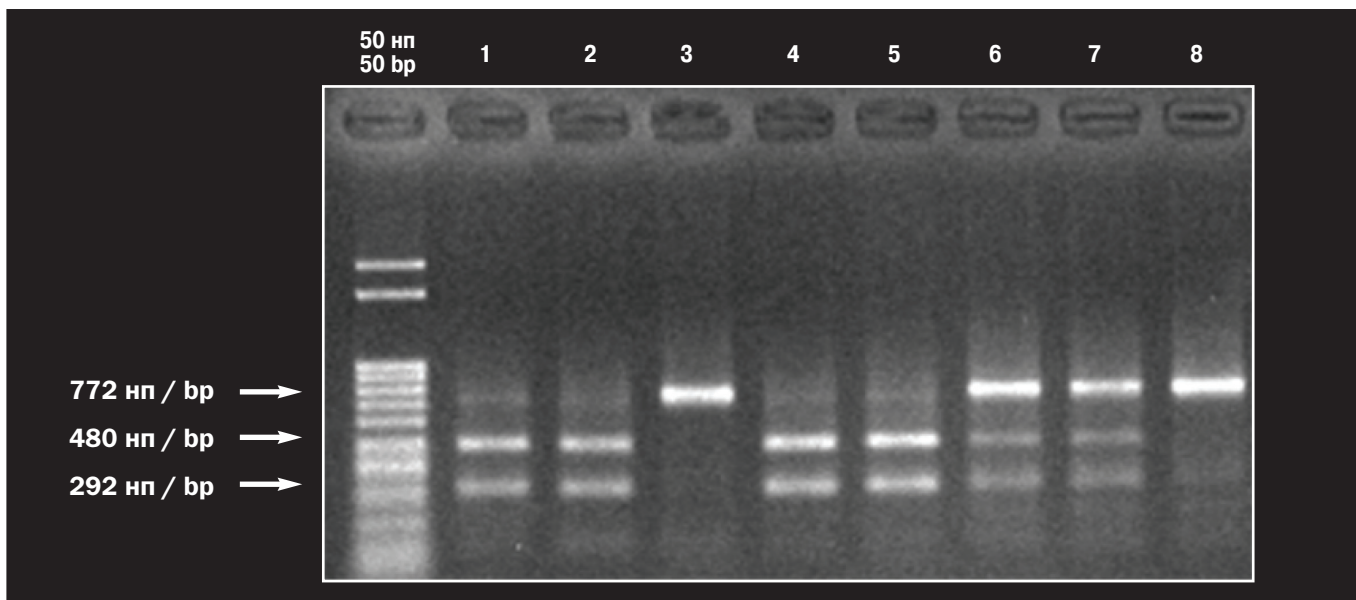


Рисунок 1. Результати визначення поліморфізму rs2124594 методом полімеразної ланцюгової реакції з наступною рестрикцією отриманих продуктів рестриктазою KpnI.

Смуги 1, 2, 4, 5 – генотип ТТ; 3, 8 – генотип СС; 6, 7 – генотип СТ.

Figure 1. Results of rs2124594 polymorphism detection by method of polymerase chain reaction with following fragments restriction by the restriction enzyme KpnI.

Bands 1, 2, 4, 5 – TT genotype; 3, 8 – CC genotype; 6, 7 – CT genotype.

Результати ПЛР (ампліфікація обраної ділянки хромосоми 8q24 та наявність С або Т алеля) були підтвержені прямим секвенуванням продуктів реакції (рис. 2).

Direct Sanger sequencing confirmed the PCR results (amplification of selected part of chromosome 8q24 and presence of the C or T allele, Fig. 2).

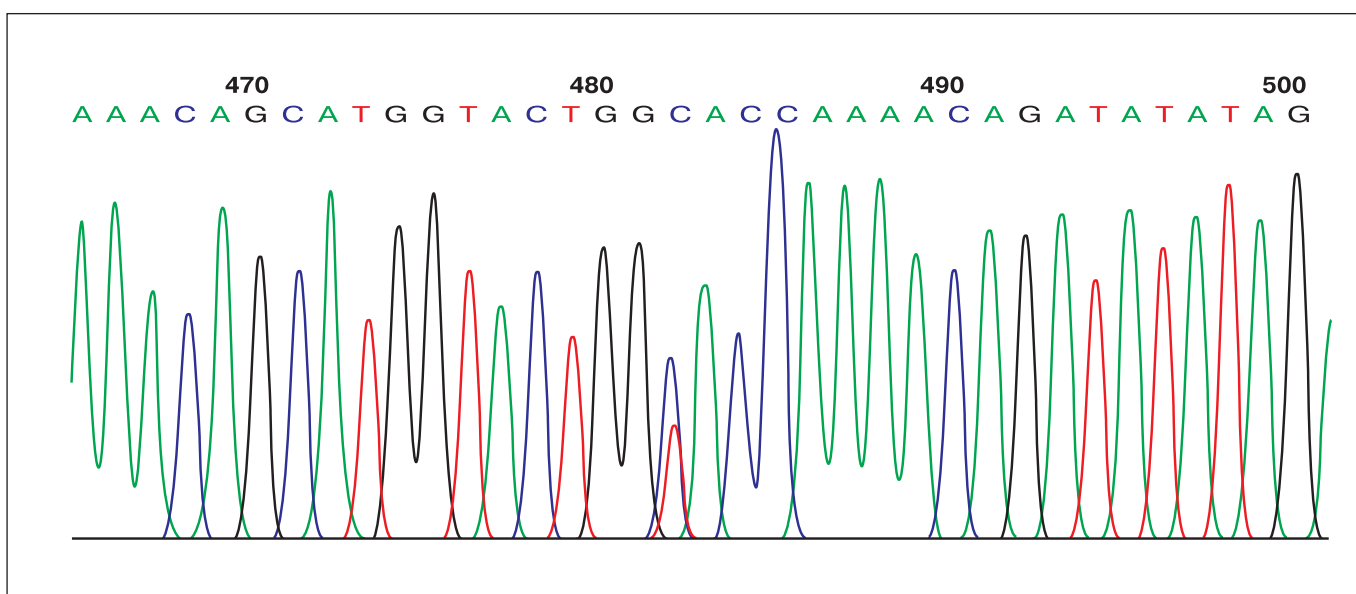


Рисунок 2. Пряме секвенування за Sanger методом, представлено СТ генотип за rs2124594.

Figure 2. Direct Sanger sequencing, CT genotype of rs2124594.

Статистичну обробку проводили у програмі SNPstats tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>).

Statistical calculations were performed with SNPstats tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>).

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

В групі обстежених, хворих на ХЛЛ, порівняно з практично здоровими особами виявлено значне зниження частоти генотипу ТТ і збільшення носіїв С алеля передусім за рахунок гетерозиготного генотипу СТ (табл. 1).

Це обумовлювало підвищення ризику розвитку ХЛЛ у носіїв поліморфного алеля С і генотипу СТ (табл. 2).

RESULTS AND DISCUSSION

Comparing to healthy persons, among CLL patients we found significant decrease of TT genotype frequency and increased frequency of C allele carriers, mainly due to increase of CT heterozygous genotype (Table 1).

This caused higher CLL risk in carriers of polymorphic C allele and CT genotype (Table 2).

Таблиця 1

Розподіл генотипів за rs2124594 серед обстежених хворих на ХЛЛ, у порівнянні з практично здоровими особами

Table 1

The distribution of rs2124594 genotypes among observed CLL patients compared to healthy persons

Групи осіб Groups of persons	Кількість осіб (%) з генотипами за rs2124594 Number of persons (%) with rs2124594 genotypes			Частота алеля С C allele frequency	p
	ТТ	СТ	СС		
Хворі на ХЛЛ / CLL patients	31 (28,4)	66 (60,6)	12 (11,0)	0,42	
Фіни (Фінляндія) / Finns (Finland)*	46 (46,5)	40 (40,4)	13 (13,1)	0,333	0,012
Брити і шотландці (Велика Британія) Britons and Scots (Great Britain)*	41 (45,1)	41 (45,1)	9 (9,9)	0,324	0,05
Іберійці (Іспанія) / Iberians (Spain)*	54 (50,5)	46 (43,0)	7 (6,5)	0,28	0,003
Тосканці (Італія) / Tuscans (Italy)*	61 (57,0)	35 (32,7)	11 (10,3)	0,266	0,001

Примітка. * – практично здорові особи (<http://www.1000genomes.org/>).
Note. * – healthy persons (<http://www.1000genomes.org/>).

Таблиця 2

Ризик розвитку ХЛЛ у носіїв окремих генотипів rs2124594

Table 2

CLL risks in carriers of different rs2124594 genotypes

Модель успадкування Model of inheritance	Генотип Genotype	Здорові особи Healthy persons	Хворі на ХЛЛ CLL patients	OR (95% CI)*	p
Кодомінантна / Co-dominant	ТТ	238	30	1,00	0,0005
	СТ	217	67	2,45 (1,54 – 3,91)	
	ТТ	48	12	2,12 (0,92 – 4,92)	
Домінантна / Dominant	ТТ	238	30	1,00	0,0003
	СТ+СС	265	79	2,37 (1,50 – 3,73)	
Рецесивна / Recessive	ТТ+СТ	455	97	1,00	0,65
	СС	48	12	1,17 (0,60 – 2,29)	
Овердомінантна / Over-dominant	ТТ+СС	286	42	1,00	0,0012
	СТ	217	67	2,10 (1,38 – 3,21)	

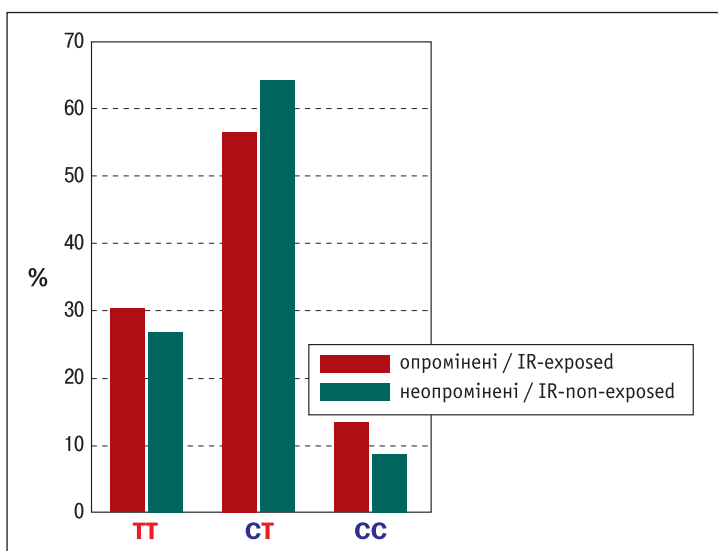
Примітка. *OR (Odds ratio) – показник співвідношення шансів; CI (confidence interval) – довірчий інтервал.
Note. *OR – Odds ratio; CI – confidence interval.

Слід зазначити, що розподіл генотипів rs2124594 у обстежених нами хворих на ХЛЛ співпадав (p = 0,377) з розподілом генотипів за rs2456449 в групі хворих на ХЛЛ, досліджених Crowther-Swanepoel зі

It should be noted that the distribution of rs2124594 genotypes in observed CLL patients from our group corresponded (p = 0.377) to the distribution of rs2456449 in CLL patients from the study of

співавт. [3]. Ми провели таке порівняння, враховуючи практично повну відповідність між носійством алелів Т (rs2124594) і А (rs2456449) та С і (rs2124594) і G (rs2456449).

Водночас, розбіжності між хворими залежно від радіаційного анамнезу виявились невірогідними (рис. 3). Спостерігалась лише тенденція до підвищення частоти гомозигот СС за поліморфним алелем серед опромінених пацієнтів, але розбіжності між опроміненими і неопроміненими хворими виявились незначущими ($p = 0,12$). Частота поліморфної алелі С між вказаними підгрупами співпадала (0,44 та 0,39; $p = 0,867$).



Таким чином, запропоновано метод визначення поліморфізму rs2124594 в некодуючій ділянці хромосоми 8q24 як сурогатного маркера поліморфізму rs2456449, асоційованого з ризиком розвитку ХЛЛ. На відміну від rs2456449, визначення якого потребує секвенування ДНК, дослідження rs2124594 можна проводити більш простим і доступним методом ПЛР з наступною рестрикцією продуктів реакції. Порівняння результатів, отриманих цим методом, з результатами прямого секвенування підтвердило його валідність.

Встановлено, що у хворих на ХЛЛ в обстеженій нами групі розподіл генотипів rs2124594 співпадав з розподілом генотипів за rs2456449 серед хворих на ХЛЛ, мешканців Великої Британії, Швеції, США та Польщі [3] і достовірно відрізнявся від показників у популяції практично здорових осіб. Це підтверджує асоціацію поліморфних варіантів у ділянці 127180736-127183014 хромосоми 8q24 поблизу гена c-MYC з ризиком розвитку ХЛЛ. Вплив rs2124594 на ризик розвитку ХЛЛ спостерігався як серед опромінених, так і неопромінених хворих. Модифікуючого внеску іонізуючого випромінення на реалізацію генетичної схильності до ХЛЛ, обумовленої поліморфними

Crowther-Swanepoel et al. [3]. We made such a comparison considering close association between T allele of rs2124594 and A allele of rs2456449, and between C allele of rs2124594 and G allele of rs2456449.

At the same time, genotype frequencies in IR-exposed and IR-non exposed CLL patients did not differ significantly (Fig. 3). We found only weak tendency to increasing CC genotype frequency in IR-exposed CLL patients ($p = 0.12$). The frequencies of polymorphic C allele in IR-exposed and IR-non-exposed CLL patients were similar (0.44 and 0.39; $p = 0.867$).

Рисунок 3. Розподіл носіїв окремих генотипів за rs2124594 серед опромінених та неопромінених хворих на ХЛЛ.

Figure 3. The distribution of rs2124594 genotypes in IR-exposed and IR-non-exposed CLL patients.

In summary, we propose a method for detection of rs2124594 in noncoding region of 8q24 as surrogate marker of rs2456449 associated with CLL risk. In contrast to rs2456449, which detection needs direct DNA sequencing, the determination of rs2124594 is possible by restriction fragment length polymorphism method. The comparison of the results obtained by restriction analysis with the results of direct sequencing confirmed the validity of proposed method.

It was found that the distribution of rs2124594 genotypes in observed CLL patients from our group corresponded to the distribution of rs2456449 in CLL patients from Great Britain, Sweden, USA and Poland [3], and significantly differed from data of healthy persons. It is confirmed association of polymorphic variants in regions 127,180,736 bp and 127,183,014 bp of 8q24 chromosome near c-MYC gene with CLL risk. Influence of rs2124594 on CLL risk was found in IR-exposed and in IR-non exposed CLL patients. Modifying influence of IR on realization of genetic predisposition to CLL risk based on

варіантами rs2124594, в даному пілотному дослідженні не виявлено.

ВИСНОВКИ

1. Підтверджена асоціація поліморфних варіантів у ділянках 127180736 і 127183014 хромосоми 8q24 поблизу гена c-MYC з ризиком розвитку ХЛЛ.
2. Модифікуючого внеску іонізуючого випромінювання на реалізацію генетичної схильності до ХЛЛ, обумовленої поліморфними варіантами rs2124594, в даному пілотному дослідженні не виявлено.

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи за галузевим планом Національної академії медичних наук України (№ держреєстрації 0117U000623).

Подяка

Автори висловлюють щирю вдячність п. Томасу Хармсу, президенту благодійної організації KIHEV-Kinderhilfe Kiew e.V за допомогу у придбанні реагентів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Goldin L. R., Pfeiffer R. M., Li X., Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*. 2004. Vol. 104, no. 6. P.1850-1854.
2. Law P. J., Berndt S. I., Speedy H. E., Camp N. J., Sava G. P., Skibola C. F., et al. Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. P. e.14175. doi: 10.1038/ncomms14175.
3. Crowther-Swanepoel D., Broderick P., Di Bernardo M. C., Dobbins S. E., Torres M., Mansouri M., et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42, no. 2. P. 132-136. doi: 10.1038/ng.510.
4. Di Bernardo M. C., Crowther-Swanepoel D., Broderick P., Webb E., Sellick G., Wild R., et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2008. Vol. 40, no. 10. P. 1204-1210. doi: 10.1038/ng.219.
5. Slager S. L., Rabe K. G., Achenbach S. J., Vachon C. M., Goldin L. R., Strom S. S., et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood*. 2011. Vol. 117, no. 6. P. 1911-1916.
6. A global reference for human genetic variation. The 1000 Genomes Project Consortium. *Nature*. 2015. Vol. 526. P. 68-74. doi: 10.1038/nature15393.
7. Weilemann A., Grau M., Erdmann T., Merkel O., Sobhifshar U., Anagnostopoulos I., et al. Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2015. Vol. 125, no. 1. P. 124-132.

rs2124594 in this preliminary study was not revealed.

CONCLUSIONS

1. The association of polymorphic variants in regions 127,180,736 bp and 127,183,014 bp of 8q24 chromosome near c-MYC gene with CLL risk was confirmed.
2. Modifying influence of IR on realization of genetic predisposition to CLL risk based on rs2124594 in this preliminary study was not revealed.

The research was carried out within the framework of research work according to the sectoral plan of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (state registration number 0117U000623).

Acknowledgement

The authors express their sincere gratitude to Mr. Thomas Harms, the President of the charitable organization KIHEV-Kinderhilfe Kiew e.V for the help in acquiring reagents.

REFERENCES

1. Goldin LR, Pfeiffer RM, Li X, Hemminki K. Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*. 2004;104(6):1850-4.
2. Law PJ, Berndt SI, Speedy HE, Camp NJ, Sava GP, Skibola CF, et al. Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*. 2017;8:e.14175. doi: 10.1038/ncomms14175.
3. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, Dobbins SE, Torres M, Mansouri M, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat. Genet.* 2010;42(2):132-6. doi: 10.1038/ng.510.
4. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Webb E., Sellick G, Wild R, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2008;40(10):1204-10. doi: 10.1038/ng.219.
5. Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, Vachon CM, Goldin LR, Strom SS, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood*. 2011;117(6):1911-6.
6. A global reference for human genetic variation. The 1000 Genomes Project Consortium. *Nature*. 2015;526:68-74. doi: 10.1038/nature15393.
7. Weilemann A, Grau M, Erdmann T, Merkel O, Sobhifshar U, Anagnostopoulos I, et al. Essential role of IRF4 and MYC signaling

8. Huppi K., Pitt J. J., Wahlberg B. M., Caplen N. J. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Front. Genet.* 2012. No. 3. P. e69.
9. Shukla V., Shukla A., Joshi S. S., Lu R. Interferon regulatory factor 4 attenuates Notch signaling to suppress the development of chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, no. 27. P. 41081-41094.
10. Edwards T. M., Myers J. P. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Cien. Saude Colet.* 2008. Vol. 3, no. 1. P. 269-281.
11. Goldin L. R., Slager S. L. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2007. Vol. 2007, no. 1. P. 339-345.
12. Bazyka D., Gudzenko N., Dyagil I., Goroh E., Polyschuk O., Trotsuk N., Babkina N., Romanenko A. Chronic lymphocytic leukemia in Chernobyl cleanup workers. *Health Phys.* 2016. Vol. 111, no. 2. P. 186-191.
13. Zablotska L. B., Bazyka D., Lubin J. H., Gudzenko N., Little M. P., Hatch M., et al. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among Chernobyl cleanup workers. *Environ. Health Perspect.* 2013. Vol. 121, no. 1. P. 59-65.
14. Kesminiene A., Evrard A. S., Ivanov V. K., Malakhova I. V., Kurtinaitis J., Stengrevics A., et al. Risk of hematological malignancies among Chernobyl liquidators. *Radiat. Res.* 2008. Vol. 170, no. 6. P. 721-735.
- for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2015;125(1):124-32.
8. Huppi K, Pitt JJ, Wahlberg BM, Caplen NJ. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Front. Genet.* 2012;(3):e69.
9. Shukla V, Shukla A, Joshi SS, Lu R. Interferon regulatory factor 4 attenuates Notch signaling to suppress the development of chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2016;7(27):41081-94.
10. Edwards TM, Myers JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Cien. Saude Colet.* 2008;3(1):269-81.
11. Goldin LR, Slager SL. Familial CLL: genes and environment. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2007;2007(1):339-45.
12. Bazyka D, Gudzenko N, Dyagil I, Goroh E, Polyschuk O, Trotsuk N, Babkina N, Romanenko A. Chronic lymphocytic leukemia in Chernobyl cleanup workers. *Health Phys.* 2016;111(2):186-91.
13. Zablotska LB, Bazyka D, Lubin JH, Gudzenko N, Little MP, Hatch M, et al. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among Chernobyl cleanup workers. *Environ. Health Perspect.* 2013;121(1):59-65.
14. Kesminiene A, Evrard AS, Ivanov VK, Malakhova IV, Kurtinaitis J, Stengrevics A, et al. Risk of hematological malignancies among Chernobyl liquidators. *Radiat. Res.* 2008;170(6):721-35.

Стаття надійшла до редакції 8.08.2017

Received: 8.08.2017