

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА-ОНКОСУПРЕССОРА p53: ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ В РИСКЕ РАЗВИТИЯ РАКА ЛЕГКОГО

П.А. Гервас<sup>1</sup>, Н.В.Чердынцева<sup>1</sup>, В.А.Белявская<sup>3</sup>, М.В. Васильева<sup>2</sup>,  
А.Ю. Добродеев<sup>1</sup>, Ю.Н. Рудык<sup>1</sup>, С.В.Миллер<sup>1</sup>, С.А. Тузиков<sup>1</sup>, М.И.Воевода<sup>4</sup>

*ГУ «НИИ онкологии Томского научного центра СО РАМН»<sup>1</sup>  
ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск<sup>2</sup>  
ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» МЗ СР, п. Кольцово, Новосибирская обл.<sup>3</sup>  
ГУ «НИИ терапии СО РАМН», г. Новосибирск<sup>4</sup>*

Проведено исследование распределения генотипов гена p53 (дупликация 16 пар нуклеотидов в 3 интроне, Arg/Pro полиморфизм в 72 кодоне 4 экзона и MspI-полиморфизм в 6 интроне) в разных возрастных группах больных раком легкого. Оценка полиморфизма гена p53 проводилась с помощью ПЦР-ПДРФ анализа. Показано, что риск развития рака легкого для лиц в возрасте моложе 55 лет ассоциирован с гетерозиготным состоянием по полиморфным сайтам 3 интрона и 4 экзона, а также наличием неблагоприятной комбинации гетерозигот по минорному аллелю для всех изучаемых полиморфизмов. В общей группе больных РЛ не выявлено таких четких ассоциаций, более того, распределение изучаемых генотипов существенно различалось для больных из групп моложе и старше 55 лет, что указывает на определенные различия факторов риска заболевания раком легкого в молодом возрасте по сравнению со старшей возрастной группой.

Ключевые слова: рак легкого, ген-онкосупрессор p53, возраст больных.

### POLYMORPHISM OF P53 GENE-ONCOSUPPRESSOR: AGE-SPECIFIC FEATURES IN THE RISK OF LUNG CANCER DEVELOPMENT

*P.A. Gervas<sup>1</sup>, N.V. Cherdyntseva<sup>1</sup>, V.A. Belyavskaya<sup>3</sup>, M.V. Vasilyeva<sup>2</sup>,  
A.Yu. Dobrodeev<sup>1</sup>, Yu.V. Rudyk<sup>1</sup>, S.V. Miller<sup>1</sup>, S.A. Tuzikov<sup>1</sup>, M.I. Voevoda<sup>4</sup>  
Cancer Research Institute, Tomsk Scientific Center, SB RAMS, Tomsk<sup>1</sup>  
Siberian State Medical University, Tomsk<sup>2</sup>  
«Vector» Virusology and Biotechnology Research Centre, Koltsovo,  
Novosibirsk region<sup>3</sup>  
Therapy Research Institute, SB RAMS, Novosibirsk<sup>4</sup>*

Distribution of genotypes of p53 gene (duplication of 16 pairs of nucleotides at intron 3, Arg/Pro polymorphism at codon 72 of exon 4 and MspI-polymorphism at intron 6) in various age groups of lung cancer patients was studied. Assessment of p53 gene polymorphism was carried out using PCR-RFLP techniques. Risk of lung cancer development for patients aged younger 55 years was shown to associate with heterozygous genotypes at polymorphic sites of intron 3 and exon 4 as well as with the presence of unfavorable combination of heterozygotes at minor allele for all studied polymorphisms. No such associations were found in the studied group of patients with lung cancer. Distribution of genotypes significantly differed between patients of younger 55 years and older 55 years indicating the differences in risk factors for breast cancer of younger-aged patients as compared to older-aged patients.

Key words: lung cancer, p53 gene-oncosuppressor, age of patients

Рак легкого (РЛ) является одной из основных причин смерти онкологических больных большинства экономически развитых стран мира. Пик манифестации заболевания приходится на 55–60 лет, с максимумом в 65–79 лет. Однако в последние годы отмечена тенденция к ранней манифестации заболевания в возрасте моложе 55 лет, что не может не привлечь внимания врачей-онкологов. Вероятно, решающую роль в детерминации онкологического риска играют особенности индивидуального генетического фона, складывающегося из множества взаи-

модействующих полиморфных аллелей, патологический эффект которых модифицируется экзогенными и эндогенными факторами (курение, этническая принадлежность, особенности образа жизни и т.д.). На популяционном уровне можно было бы ожидать увеличения в группе больных раком легкого в возрасте до 55 лет частоты неблагоприятных (минорных) аллелей или их сочетаний, которые негативно модулируют физико-химические свойства и параметры функциональной активности их продуктов, что увеличивает риск возникновения злокачествен-

ной трансформации в условиях патогенетически значимых экзогенных влияний.

Для удобства обозначения полиморфных аллелей используют термины «мажорный и минорный». Как правило, мажорный («дикий», wild) аллель является наиболее широко распространенным в популяции и характеризуется неизменной функциональной активностью, тогда как минорный аллель («мутантный», mutant) встречается редко и обуславливает некоторые физико-химические вариации в активности кодируемого белка [1].

Ключевым участником процессов поддержания генетической стабильности и сбалансированного действия систем регуляции деления клеток выступает мультифункциональный белок p53 [8]. Для гена p53 установлено 19 полиморфизмов, из которых три считаются вовлеченными в канцерогенез: в 3 интроне, 4 экзоне, 6 интроне. 72 кодон 4 экзона гена p53 может быть представлен тремя генотипами (Arg/Arg, Arg/Pro, Pro/Pro) в результате однонуклеотидной замены гуанина (G) на цитозин (C) (CGC – аргинин, CCC – пролин). Полиморфизм в 72 кодоне 4 экзона является наиболее функционально значимым, так как затрагивает ДНК-связывающий домен. При изучении биохимической, биологической, структурной сходности белка при разных генотипах 4 экзона p53 выявлено, что аргининовый и пролиновый варианты обладают разной способностью к взаимодействию и активации транскрипции генов-мишеней, что может иметь значение при задержке клеточного деления [6, 10, 13].

Полиморфизм 3 интрона обусловлен дупликацией 16 пар нуклеотидов и представлен тремя генотипами (w/w, w/dup16, dup16/dup16). Установлено, что онкоген MDM2 имеет несколько промоторов и один из них находится в 3 интроне, т.е. полиморфизм данного интрона может быть причастен к нарушению процессов активации транскрипции генов-мишеней, необходимых для остановки клеточного цикла и запуска апоптоза, так как MDM2 связывается с N-концом молекулы p53 и стимулирует убиквитинизацию и протеосомную деградацию белка p53 [9].

Полиморфизм 6 интрона широко изучен при раке молочной железы и ассоциирован с синдро-

мом Ли–Фраумени, представлен включением аденина в сайт, узнаваемый эндонуклеазой рестрикции MspI (C:CAGG), и за счет этого данный сайт не распознается или теряется (C:CGG) [4]. D. Barel et al. [4] установили, что данный полиморфизм может изменять экспрессию белка p53. E. Biros et al. [5] показали значимое повышение частоты гетерозигот по 6 интрону у больных раком легкого по сравнению с контролем. A. Szymanowska et al. [11] оценивали частоту гомо- и гетерозигот по 4 экзону в группе больных РЛ до 60 лет и старше, но не выявили значимых различий между группами [12]. X. Wu et al. [14], исследуя комбинации генотипов гена p53, выявил, что минорные аллели являются фактором риска возникновения рака легкого. Однако в целом данные литературы о вкладе комбинаций генотипов гена p53 в риск РЛ достаточно противоречивы и не отражают связь с возрастом.

Целью настоящей работы было исследование распределения генотипов гена p53 и их комбинаций (дупликация 16 пар нуклеотидов в 3 интроне, Arg/Pro полиморфизм в 72 кодоне 4 экзона и MspI-полиморфизм в 6 интроне) у больных раком легкого в разных возрастных группах.

## Материал и методы

В исследование включено 177 больных раком легкого, получавших лечение в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, среди которых было 164 мужчины и 12 женщин (93 % и 7 % соответственно), средний возраст составил  $60,3 \pm 8,6$  года. Группы больных разделены на две возрастные категории: до 55 лет (от 32 до 54, средний возраст  $48,6 \pm 4,9$  года,  $n=42$ ) и старше 55 лет (от 55 до 80, средний возраст  $63,9 \pm 5,8$  года,  $n=128$ ), в обеих группах высокий процент курильщиков, 89 % и 82 %, соответственно. Группу контроля составили 198 здоровых мужчин региона Западной Сибири, средний возраст  $55,6 \pm 6,8$  года (материалы любезно предоставлены М.И. Воеводой, НИИ терапии СО РАМН, г. Новосибирск).

ДНК была выделена из цельной венозной крови с использованием протеиназы К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией. Оценка полиморфизма гена p53 проводилась

с помощью ПЦР (dup16 bp в 3 интроне), использовали следующие олигонуклеотиды: 5'-GGGACTGACTTTCTGCTCTT-3' и 5'-TC-AAATCATCCATTGCTTGG-3') и ПЦР-ПДРФ (Arg/Pro полиморфизм 4 экзона, 5'-CTGGTA-AGGACAAGGGTTGG-3' и 5'-ACTGACCGT-GCAAGTCACAG-3') и MspI-полиморфизм в 6 интроне, 5'-TGGCCATCTACAAGCAGTCA-3' и 5'-TTGCACATCTCATGGGGTTA-3') [14].

В таблицах указана частота встречаемости изучаемых генотипов как отношение количества лиц с данным генотипом к общему числу лиц в группе. Распределения генотипов по исследованным полиморфным локусам в контрольных выборках проверены на соответствие ожидаемым при равновесии Харди-Вайнберга с помощью точного критерия Фишера. При сравнении частот генотипов использовался стандартный критерий  $\chi^2$  Пирсона. Для отклонения нулевой гипотезы (отсутствие различий) принимали уровни статистической значимости  $p \leq 0,05$ . Относительный риск (odd ratio, OR) развития заболевания при определенном генотипе рассчитывался по стандартной формуле  $OR = a/b \times d/c$ , где  $a$  и  $b$  – количество больных, имеющих и не имеющих вариантный генотип соответственно,  $c$  и  $d$  – количество человек в контрольной группе, имеющих и не имеющих вариантный генотип. OR указан с 95 % доверительным интервалом [3].

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93, № 2288).

## Результаты и обсуждение

На первом этапе мы изучили распределение генотипов гена p53 (3 интрон, 4 экзон, 6 интрон) в группах больных раком легкого и здоровых лиц для выяснения их взаимосвязи с риском рака легкого (табл. 1). В дальнейшем нами был выполнен пошаговый анализ частот генотипов гена p53 в зависимости от возраста больных раком легкого (сравнивали последовательно следующие группы: до 50 и старше 50 лет, до 55 и старше 55 лет, до 60 и старше 60 лет) в сравнении с контролем, наиболее значимые различия были выявлены для групп больных раком легкого в возрасте до 55 лет и старше 55 лет.

Частота встречаемости генотипов по 3 интрону и 4 экзону в общей группе больных раком легкого не имела различий с контролем. Обнаружено снижение частоты встречаемости гетерозигот по 6 интрону среди больных раком легкого в сравнении с группой контроля (0,31 и 0,21, соответственно,  $p < 0,01$ ,  $OR = 0,50$ ,  $CI$  95 % 0,34–0,92). Таким образом, гетерозиготное состояние по 6 интрону можно рассматривать в качестве фактора, снижающего риск рака легкого. В ходе анализа данных по возрастным критериям было выявлено, что частота гетерозигот по 6 интрону в группе больных раком легкого до 55 лет не отличается от контрольной (0,31 и 0,29 соответственно), и в то же время существенно снижена в группе больных старше 55 лет по сравнению с группой контроля – 0,18 ( $p \leq 0,00$ ,  $OR = 0,47$ ,  $CI$  95 % 0,27–0,83). Таким образом, нами выявлена возрастная зависимость в распределении гетерозигот по 6 интрону, т.е. снижение частоты гетерозиготного генотипа в общей группе больных РЛ происходит за счет больных раком легкого старше 55 лет.

В общей группе больных не отмечено различий с контролем по распределению полиморфных генотипов по 3 интрону и 6 экзону. Выявлена тенденция к увеличению частоты гетерозигот по 3 интрону в группе больных раком легкого до 55 лет по сравнению с группой контроля (0,32 и 0,21, без статистически значимых отличий,  $p < 0,13$ ). У больных старше 55 лет частота генотипа w/dup16 не отличается от уровня группы контроля (0,21 и 0,19) и существенно ниже, чем в группе больных РЛ более молодого возраста ( $p < 0,07$ ).

Частота генотипа Arg/Pro 4 экзона составила 0,62 в группе больных до 55 лет, что значимо выше, чем в группе контроля – 0,42 ( $p \leq 0,017$ ,  $OR = 2,28$ ,  $CI$  95 % 1,09–4,78) и в группе больных после 55 лет – 0,31 ( $p \leq 0,00$ ,  $CI$  95 % 1,63–7,82). Полученные данные указывают на ассоциацию гетерозиготных генотипов (3 интрон и 4 экзон) с риском возникновения РЛ для лиц моложе 55 лет.

Далее для разных возрастных групп был проведен анализ генотипических комбинаций трех полиморфизмов гена p53 (dup16 bp-полиморфизм в 3 интроне, Arg/Pro-полиморфизм в 72 кодоне 4 экзона, MspI-полиморфизм в 6 интроне). Из различных сочетаний генотипов

Таблица 1

**Распределение генотипов гена p53 (3 интрон, 4 экзон, 6 интрон)  
у больных раком легкого в зависимости от возраста**

Генотипы гена p53	Группа контроля	Рак легкого	Больные раком легкого		OR, X <sup>2</sup>
			до 55 лет	после 55 лет	
интрон 3					
w/w	0,78 (153/196)	0,78 (138/176)	0,68 (28/41)	0,85 (109/134)	**-p≤0,07, X <sup>2</sup> =3,15
w/m	0,21 (41/196)	0,22 (38/176)	0,32** (13/41)	0,19 (25/134)	
m/m	0,01 (2/196)	0	0	0	
экзон 4					
w/w	0,45 (88/192)	0,54 (95/177)	0,31 (13/42)	0,62 (82/134)	* -p≤0,017, X <sup>2</sup> =5,70 OR=2,28, CI 95 % 1,09–4,78 **-p≤0,00, X <sup>2</sup> =12,60
w/m	0,42 (80/192)	0,39 (69/177)	0,62* ** (26/42)	0,31 (42/134)	
m/m	0,13 (24/192)	0,07 (13/177)	0,07 (3/42)	0,07 (10/134)	
Интрон 6					
w/w	0,61 (118/195)	0,79 (139/175)	0,71 (29/41)	0,92 (109/133)	* - p≤0,01, X <sup>2</sup> =5,97 OR =0,50 CI 95 % 0,34–0,92 * -p≤0,00, X <sup>2</sup> =7,73 OR=0,47, CI 95 % 0,27–0,83
w/m	0,31 (62/195)	0,21* (36/175)	0,29 (12/41)	0,18* (24/133)	
m/m	0,08 (15/195)	0	0	0	

Примечание: 3 интрон: W (wild) – отсутствие dup16 bp, M (mutant) – наличие dup16 bp; 4 экзон: W – Arg-аллель в 72 кодоне 4 экзона, M – Pro-аллель в 72 кодоне 4 экзона; 6 интрон: W – наличие сайта рестрикции MspI, M – отсутствие сайта рестрикции MspI;  
\* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, \*\* – различия статистически значимы между основными группами.

трех локусов наиболее распространенными комбинациями являются: WW-WW-WW (наличие диких генотипов), WW-WM-WW (гетерозиготность по 4 экзону Arg/Pro) и WM-WM-WM (гетерозиготность по всем исследуемым полиморфизмам) (табл. 2).

Сочетание мажорных генотипов гена p53 (w/w-w/w-w/w) является наиболее частой комбинацией в группах больных и здоровых. Выявлено статистически значимое превышение частоты данной комбинации у больных РЛ по сравнению с контролем (0,49 и 0,28 соответственно, p≤0,00, OR=2,53, CI 95 % 1,60–4,00). При разделении группы рака легкого по возрасту частота данной комбинации значимо выше в старшей группе больных раком легкого, чем в контроле (0,56 и

0,28, соответственно, p≤0,00, OR=4,01, CI 95 % 1,43–11,3), и выше, чем в группе больных до 55 лет – 0,30 (p≤0,00). Таким образом, для больных раком легкого старше 55 лет сочетание мажорных генотипов гена p53 (w/w-w/w-w/w) ассоциировано с риском возникновения рака легкого. Поскольку комбинация мажорных генотипов кодирует функционально полноценный белок p53, можно полагать, что повышенный риск развития рака легкого у лиц старшего возраста может быть обусловлен длительной экспозицией канцерогенных воздействий внешней среды, снижением противоопухолевой резистентности организма, при этом решающим фактором может служить замедление с возрастом скорости репарации ДНК с одновременным накоплением

Таблица 2

**Распределение комбинации генотипов (3 интрон-4 экзон- 6 интрон) гена p53  
у больных раком легкого в зависимости от возраста**

Гены	Группа контроля	Рак легкого	Больные раком легкого	
			до 55 лет	после 55 лет
комбинация генотипов гена p53				
w/w-w/w-w/w	0,28 (53/187)	0,49* (86/174) p<0,000	0,30** (12/40) p≤0,00	0,56* (74/133) p≤0,00
w/w-w/m-w/w	0,21 (39/187)	0,22 (38/174)	0,28 (11/40)	0,20 (26/133)
w/m-w/m-w/m	0,04 (8/187)	0,13* (23/174) p<0,004	0,25* ** (10/40) p≤0,002, p≤0,02	0,10* (13/133) p≤0,08

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, \*\* – различия статистически значимы между основными группами.

мутаций и хромосомных aberrаций в генах, функционально связанных с геном p53 [2].

Частота распределения комбинации диких генотипов по 6 и 3 интрон и гетерозиготой по 4 экзону (w/w-w/m-w/w) не различалась значимо в группах наблюдения и составила 0,21 для группы контроля, 0,28 для группы больных раком легкого до 55 лет и 0,20 после 55 лет. Это подтверждает предположение о том, что определенные сочетания гомо- и гетерозигот могут играть решающую роль в функциональной активности белка, в данном случае гомозиготы по мажорным аллелям нивелируют функциональную неполноценность гетерозигот, несущих минорные аллели.

Изучение вариантных комбинаций гена p53 выявило статистически значимое повышение частоты комбинации (w/m-w/m-w/m) в общей группе больных РЛ по сравнению с контролем (0,04 и 0,13, p<0,004, OR=2,93, CI 95 % 1,29–6,71), очевидно, что это произошло за счет группы больных младше 55 лет, так как частота данной комбинации в этой группе составила 0,25 (p≤0,002, OR=3,32, CI 95 % 1,38–8,08). У больных старше 55 лет частота данной комбинации генотипов выше уровня группы контроля (0,04 и 0,10, p≤0,08) и статистически значимо ниже, чем в группе больных РЛ более молодого возраста (0,25 и 0,10, p≤0,02). Ассоциация повышенной частоты комбинации гетерозиготных

генотипов (несущих минорные аллели) гена p53 с раком легкого может быть обусловлена нарушением функции p53. X. Wu et al. [14] показано, что по мере увеличения числа минорных аллелей в каждом локусе гена p53 наблюдается снижение показателей апоптотического индекса и эффективности репарации ДНК в лимфобластоидных клеточных линиях, полученных от здоровых людей.

Таким образом, риск развития рака легкого для лиц в возрасте моложе 55 лет ассоциирован с гетерозиготным состоянием по полиморфным сайтам 3 интрона и 4 экзона, а также наличием неблагоприятной комбинации гетерозигот по минорному аллелю для всех изучаемых полиморфизмов. Это может способствовать накоплению генетически измененных клеток на фоне неблагоприятных воздействий окружающей среды за счет нарушения функции p53, а следовательно, и процессов апоптоза и репарации ДНК. В общей группе больных РЛ не выявлено таких четких ассоциаций, более того, распределение изучаемых генотипов существенно различалось для больных из групп моложе и старше 55 лет, что указывает на определенные различия факторов риска заболевания раком легкого в молодом возрасте по сравнению со старшей возрастной группой.

Изучение комбинаций генотипов гена p53 может повысить информативность исследования,

так как каждый полиморфизм по отдельности обладает лишь весьма умеренным эффектом. Обобщая результаты оценки вклада минорных аллелей гена p53 на выборке больных раком легкого Западной Сибири, можно говорить о возможном плейотропном влиянии гена p53 на риск развития рака легкого в зависимости от сочетания как минимум трех его вариантных сайтов по 3 и 6 интону и 4 экзону. Эти исследования также подтверждают, что полиморфизм ДНК даже вне кодирующей области может быть связан с ослаблением или усилением функции гена.

Работа выполнена в рамках гранта МНТЦ № 2311.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белогубова Е.В., Того А.В., Кондратьева Т.В. и др. Полиморфизм гена GSTM1 в группах предрасположенности и резистентности к раку легкого // Вопросы онкологии. 2000. Т. 46, № 5. С. 549–554.
2. Свердлов Е.Д. Очерки современной молекулярной генетики. Болезни генома и новая молекулярная генетика // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 1999. № 5. С. 3–22.
3. Флейс Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций. М.: Финансы и статистика, 1989. 319 с.
4. Barel D., Avigad S., Cohen I.J. et al. A novel germline p53 insertion/duplication mutation in intron 6 in a Li-Fraumeni Family // Cancer Research. 1994. Vol. 54. P. 1298–1304.
5. Biros E., Kalina I., Kohut A. et al. Germ line polymorphisms of the tumor suppressor gene p53 and lung cancer // Lung Cancer. 2001. Vol. 31. P. 157–162.
6. Bourdon J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity // Genes Dev. 2005. Vol. 15, № 19(18). P. 2122–2137.
7. Fan R., Wu M.T., Miller D. The p53 Codon 72 Polymorphism and Lung Cancer Risk // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2000. Vol. 9. P. 1037.
8. Imyanitov E., Togo A., Hanson K. Searching for cancer-associated gene polymorphisms: promises and obstacles // Cancer Lett. 2004. Vol. 204, № 1. P. 3–14.
9. Liang H, Lunec J. Characterisation of a novel p53 down-regulated promoter in intron 3 of the human MDM2 oncogene // Gene. 2005. Vol. 361. P. 112–118.
10. Rom W.N., Hay J.G., Lee T.C. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000. Vol. 161, № 4. P. 1355–1367.
11. Szymanowska A., Jassem E., Dziadziuszko R. Increased risk of non-small cell lung cancer and frequency of somatic TP53 gene mutations in Pro72 carriers of TP53 Arg72Pro polymorphism // Lung Cancer. 2006. Vol. 52. P. 9–14.
12. Taioli E., Gaspari L., Benhamou S. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years // Int. J. Epidemiol. 2003. Vol. 32, № 1. P. 60–63.
13. Thomas M., Kalita A., Labrecque S. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically // Mol. Cell. Biol. 1999. Vol. 19, № 2. P. 1092–1100.
14. Wu X., Zhao H., Amos C.I. et al. p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity // J. Natl. Can. Ins. 2002. Vol. 94, № 9. P. 681–692.

Поступила 27.11.06