

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *TP53*, *MDM2* И *CDKN1A* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКА

© 2022 г. П. К. Бреннер¹, М. А. Капралова¹, Д. С. Ходырев², С. В. Хохлова³, Г. Н. Хабас³, А. В. Асатурова³, Ю. В. Носова³, Л. Н. Каюмова⁴, Т. М. Заварыкина¹, *

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 115682 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, Москва, 117198 Россия

⁴Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119435 Россия

*e-mail: tpalievskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.

После доработки 04.03.2022 г.

Принята к публикации 14.03.2022 г.

В работе получено распределение частот аллелей полиморфных участков генов системы апоптоза и контроля клеточного цикла *TP53* (rs1042522), *MDM2* (rs2279744) и *CDKN1A* (rs1801270) и проанализирована их связь с риском развития рака яичника у женщин Московского региона. В исследование включены 70 здоровых женщин-доноров и 66 больных раком яичника. Материалом исследования служила ДНК, выделенная из крови здоровых доноров и ткани и крови больных раком яичника. Определение статуса полиморфных маркеров генов проводилось методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллель-специфичными зондами. В ходе работы получены отношения шансов (ОШ) риска развития рака яичника: для аллеля *Pro* маркера *Arg72Pro* гена *TP53* ОШ = 0.94, 95% ДИ = 0.57–1.65, $p = 1.0$; для аллеля *G* маркера *T(-410)G* гена *MDM2* ОШ = 0.96, 95% ДИ = 0.49–1.89, $p = 0.90$; для аллеля *Arg* маркера *Ser31Arg* гена *CDKN1A* ОШ = 1.53, 95% ДИ = 0.76–3.09, $p = 0.29$. Для данных маркеров получены результаты, указывающие на отсутствие ассоциации с раком яичника. Выявлено, что носительство минорных аллелей маркеров *Arg72Pro* гена *TP53*, *T(-410)G* гена *MDM2* и *Ser31Arg* гена *CDKN1A* не влияет на риск развития рака яичника у женщин Московского региона.

Ключевые слова: рак яичника, полиморфный маркер, контроль клеточного цикла, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0016675822090065

Рак яичника (РЯ) является второй причиной смертности среди онкогинекологических заболеваний в мире [1]. За 2020 г. в Российской Федерации выявлено 12444 новых случаев опухолей яичников. Распространенность данного заболевания составила 80.4 случаев на 100 тыс. населения [2]. Современная теория канцерогенеза основывается на том, что помимо внешних факторов, для возникновения опухоли важно наличие генетической предрасположенности [3]. Известно, что патогенез РЯ в ряде случаев, чаще всего при наследственном варианте заболевания, тесно связан с мутациями генов-онкосупрессоров *BRCA1* и *BRCA2* [4]. Однако мутации в этих генах отвечают за 10–15% случаев РЯ. Установлено, что в поддержании стабильности генома клетки и предотвращении неопластической трансформации участвует система апоптоза и контроля клеточного цикла. Возникновение злокачественных новообразований часто связано с нару-

шением в ее функционировании. Ключевыми в системе апоптоза и контроля клеточного цикла являются гены *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A*. В литературе описано, что полиморфные маркеры этих генов связаны с повышенным риском развития ряда онкологических заболеваний, в частности, рака шейки матки, рака молочной железы, рака эндометрия, лейкоза [5–8].

В норме, в неповрежденных клетках, продукт гена *TP53* – белок p53, нестабилен и присутствует в очень низкой концентрации за счет его связывания с белком mdm2 [9]. При повреждении структуры ДНК фосфорилирование p53 снижает его связывание с mdm2. Затем белок mdm2 деградирует, что позволяет p53 накапливаться, полностью активироваться и индуцировать транскрипцию гена *CDKN1A*. Продукт гена *CDKN1A* – белок p21, взаимодействует с комплексом циклина и циклин-зависимых киназ Cyclin-CDK2/CDK1,

Таблица 1. Условия проведения анализа молекулярно-генетических маркеров

Маркер	Праймеры и зонды	$T_{отж}$, °C/ длина ампликона, пн
<i>Arg72Pro</i> <i>TP53</i> rs1042522	F: GGTGTAGGAGCTGCTGGTG R: CTGGTAAGGACAAGGGTTGGG FAM-AGGGGCCACGGGGGGAGCAG-BHQ-1 VIC-AGGGGCCACGCGGGGAGCAG-BHQ-2	63.4/271
<i>T(-410)G</i> <i>MDM2</i> rs2279744	F: GCGGGATTTTCGGACGGCTCTC R: CCCGACAGGCACCTGCGA FAM-CGGGGCCGCTTCGGCGCGGG-BHQ-1 VIC-CGGGGCCGCTGCGGCGCGGG-BHQ-2	66.4/145
<i>Ser31Arg</i> <i>CDKN1A</i> rs1801270	F: CTGGAAGGAGTGAGAGAG R: GGTGACAAAGTCGAAGTTC FAM-AGCTGAGCCGCGACTGT-BHQ-1 VIC-AGCTGAGACGCGACTGT-BHQ-2	63.8/296

Примечание. F и R – праймеры, где F – forward (прямой), R – reverse (обратный); FAM и VIC – ДНК-зонды, меченные соответствующими флуоресцентными красителями, минорному варианту маркера соответствует зонд VIC; $T_{отж}$ – температура отжига.

ингибирует его активность и предотвращает вступление клетки в S-фазу, вызывая тем самым длительную остановку клеточного цикла [10]. Исследование полиморфных маркеров наиболее важных генов контроля клеточного цикла и апоптоза при РЯ позволит лучше понимать патогенез этого заболевания.

Цель работы – изучение связи между статусом полиморфных маркеров генов *TP53* (*Arg72Pro*), *MDM2* (*T(-410)G*) и *CDKN1A* (*Ser31Arg*) и риском развития РЯ.

Исследуемые биологические образцы получены из ФГБУ “НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова” Минздрава России. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации” (от 21.11.2011 № 323-ФЗ).

Критериями включения пациентов в работу были удовлетворительное общее состояние, нормальная функция кроветворения, почек, печени, морфологически подтвержденный диагноз РЯ. Диагноз и гистологическая форма РЯ устанавливались на основании гистологического исследования в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова. В ходе работы изучена венозная кровь от 70 здоровых женщин-доноров с медианой возраста 48 лет (23–70), опухолевая ткань от 66 больных РЯ (Ia–IV стадия) с медианой возраста 51 год (28–75), у части больных (37 человек) также отобраны образцы крови. Забор образцов крови проводился до начала химиотерапии, образцы опухолевой ткани получены в ходе первичной циторедуктивной операции.

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из крови и ткани с использованием

набора реагентов Diatom DNA Prep 400 (“Лаборатория Изоген”, Россия).

Определение статуса полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53*, *T(-410)G* гена *MDM2* и *Ser31Arg* гена *CDKN1A* осуществляли методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллельспецифичными зондами на термоциклере “CFX96 Touch Real-Time System” (Bio-Rad, США). Аллельную дискриминацию проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Последовательности и температура отжига ($T_{отж}$) использованных в работе праймеров и зондов указаны в табл. 1. Реакции проводили в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, pH 8.8, 16.6 мМ сульфат аммония, 0.01%-ный Твин-20, 2 мМ хлорида магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров (“Евроген”, Россия), 250 нМ флуоресцентных зондов (“ДНК-Синтез”, Россия), 1.5 ед. Таq ДНК-полимеразы (“Евроген”). Условия амплификации фрагментов ДНК: 95°C – 20 с; 40 циклов: 95°C – 10 с, $T_{отж}$ – 30 с, 72°C – 30 с.

Статистический анализ проводился в программе Statistica 8.0 (StatSoft). При сравнении частот аллелей и генотипов использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона. Полученные результаты проверялись на соблюдение равновесия Харди–Вайнберга для каждого исследуемого полиморфного маркера в программе Arlequin 3.0. Комплексную оценку взаимосвязи между исследуемыми аллелями, генотипами и риском заболевания проводили с помощью программы Calculator for confidence intervals of odds ratio [11], определяя отношение шансов (ОШ) и 95%-ный доверительный интервал (95% ДИ). Различия при значениях $p < 0.05$ оценивались как значимые.

Таблица 2. Распределение частот генотипов полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A* у больных РЯ и здоровых доноров

Ген	Генотип	Частоты генотипов	
		опухолевая ткань ($n = 66$)	контроль ($n = 70$)
<i>TP53</i> (<i>Arg72Pro</i>)	<i>Arg/Arg</i>	0.621	0.543
	<i>Arg/Pro</i>	0.197	0.343
	<i>Pro/Pro</i>	0.182	0.114
<i>MDM2</i> (<i>T(-410)G</i>)	<i>T/T</i>	0.439	0.429
	<i>T/G</i>	0.394	0.400
	<i>G/G</i>	0.167	0.171
<i>CDKN1A</i> (<i>Ser31Arg</i>)	<i>Ser/Ser</i>	0.818	0.743
	<i>Ser/Arg</i>	0.136	0.186
	<i>Arg/Arg</i>	0.046	0.071

Таблица 3. Расчет отношения шансов риска развития РЯ для аллелей полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A*

Аллель	ОШ	95% ДИ	χ^2	p
Аллели гена <i>TP53 Arg72Pro</i>				
Аллель <i>Arg</i>	1.03	0.61–1.74	0.92	1.0
Аллель <i>Pro</i>	0.94	0.57–1.65		
Аллели гена <i>MDM2 T(-410)G</i>				
Аллель <i>T</i>	0.97	0.59–1.58	0.89	0.90
Аллель <i>G</i>	0.96	0.49–1.89		
Аллели гена <i>CDKN1A Ser31Arg</i>				
Аллель <i>Ser</i>	1.53	0.76–3.09	0.23	0.29
Аллель <i>Arg</i>	0.65	0.32–1.31		

Примечание. ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал.

В ходе работы изучено распределение генотипов полиморфных маркеров *Arg72Pro* гена *TP53*, *T(-410)G* гена *MDM2* и *Ser31Arg* гена *CDKN1A* у здоровых доноров и больных РЯ. В табл. 2 представлены частоты распределения генотипов маркеров исследуемых генов. Установлено, что распределение частот генотипов полиморфных маркеров среди контрольной группы находится в равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0.8$). При сравнении распределения частот аллелей для крови ($n = 37$) и ткани ($n = 66$), полученных от больных РЯ, не обнаружено различий между ними (точный тест Фишера, $p = 0.52–0.77$). С целью увеличения статистической мощности работы были использованы результаты для образцов ткани.

На основании полученных данных проведен расчет риска развития РЯ. Результаты для каждого из аллелей исследуемых генов представлены в табл. 3. Выявлено отсутствие различий в частоте распределения аллелей маркеров в группах здоровых доноров и больных РЯ и, следовательно,

связи с риском развития РЯ для аллелей маркеров ($p = 0.29–1.0$).

Результаты расчета отношения шансов риска развития РЯ для каждого из генотипов исследуемых генов, вычисленные с использованием кодоминантной модели наследования, представлены в табл. 4. Для маркера *Arg72Pro* гена *TP53* (при использовании кодоминантной модели) носительство генотипа *Pro/Pro* связано с тенденцией к повышению риска развития РЯ (ОШ = 1.55, 95% ДИ = 0.39–4.36, $p = 0.13$). В случае доминантной и рецессивной моделей наследования связи с развитием РЯ не выявлено (ОШ = 0.72, 95% ДИ = 0.37–1.44, $p = 0.39$ и ОШ = 1.72, 95% ДИ = 0.66–3.31, $p = 0.34$ соответственно).

При изучении генотипов маркера *T(-410)G* гена *MDM2* с использованием кодоминантной и рецессивной моделей наследования связь с риском РЯ не обнаружена (ОШ = 1.0, 95% ДИ = 0.33–3.02, $p = 1.0$ и ОШ = 0.97, 95% ДИ = 0.39–2.37, $p = 1.0$ со-

Таблица 4. Расчет отношения шансов риска развития РЯ для генотипов полиморфных маркеров генов *TP53*, *MDM2* и *CDKN1A*

Аллель	ОШ	95% ДИ	χ^2	<i>p</i>
Генотипы гена <i>TP53 Arg72Pro</i>				
<i>Arg/Arg</i>	1.03	0.30–3.39	4.07	0.13
<i>Arg/Pro</i>	0.61	0.22–2.45		
<i>Pro/Pro</i>	1.55	0.39–4.36		
Генотипы гена <i>MDM2 T(-410)G</i>				
<i>T/T</i>	1.03	0.34–3.07	0.02	1.0
<i>T/G</i>	0.97	0.33–2.95		
<i>G/G</i>	1.00	0.33–3.02		
Генотипы гена <i>CDKN1A Ser31Arg</i>				
<i>Ser/Ser</i>	1.53	0.26–8.00	1.15	0.62
<i>Ser/Arg</i>	0.67	0.13–3.87		
<i>Arg/Arg</i>	1.05	0.19–5.75		

Примечание: ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал.

ответственно) также, как и в случае доминантной модели (ОШ = 0.59; 95% ДИ = 0.3–1.16; $p = 0.17$).

Ассоциации генотипов маркера *Ser31Arg* гена *CDKN1A* с развитием РЯ также обнаружено не было (кодоминантная модель: ОШ = 1.05, 95% ДИ = 0.19–5.75, $p = 0.62$; доминантная модель: ОШ = 1.44, 95% ДИ = 0.63–3.31, $p = 0.41$; рецессивная модель: ОШ = 0.62, 95% ДИ = 0.14–2.70, $p = 0.72$).

Нами выявлено, что носительство аллеля *Pro* полиморфного маркера *Arg72Pro* гена *TP53* не связано с риском развития РЯ у женщин Московского региона. Подобные результаты получены в мета-анализе А. Zhang с соавт., где при исследовании выборки, состоящей в основном из европейцев (90.1% среди больных РЯ и 89.4% среди контрольной группы), получено, что аллель *Pro* не связан с повышенным риском развития РЯ (ОШ = 1.06, 95% ДИ = 0.93–1.20) [12]. При рассмотрении генотипов в нашей работе выявлена тенденция к повышению риска развития РЯ для генотипа *Pro/Pro* в случае кодоминантной модели наследования. Схожие данные получены S. Dholariya с соавт. при анализе распределения генотипов в индийской популяции. Авторами установлено, что носительство генотипа *Pro/Pro* полиморфного маркера *Arg72Pro* связано с повышенным риском развития РЯ (ОШ = 4.40, 95% ДИ = 1.40–13.99) [13].

При изучении полиморфного маркера *T(-410)G* гена *MDM2* связи с риском развития РЯ как для аллелей, так и для генотипов маркера нами не выявлено. При анализе литературы не обнаружено подобных работ, посвященных исследованию связи маркера *T(-410)G* гена *MDM2* с риском развития РЯ. Однако L.V. Gansmo с соавт. показали отсутствие связи с риском развития дан-

ного вида опухоли для другого полиморфного маркера del1518 (rs3730485) гена *MDM2* [14]. В ходе работы установлено, что носительство минорного аллеля *Arg* маркера гена *CDKN1A* не связано с повышением риска развития РЯ. В научной литературе отсутствуют работы по исследованию связи маркера *Ser31Arg* гена *CDKN1A* с развитием данного заболевания.

Таким образом, в настоящей работе выявлено, что носительство минорных аллелей генов контроля клеточного цикла *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A* не связано с риском развития РЯ у жительниц Московского региона. Понимание патогенеза онкологических заболеваний важно не только с фундаментальной, но и с клинической точки зрения, оно может позволить выявлять новые мишени и возможности для терапии. Связь функционально значимых полиморфных маркеров генов с риском развития определенного вида рака показывает, насколько важен данный ген для патогенеза этого заболевания. В случае отсутствия связи, полученные результаты не менее важны, так как позволяют сфокусировать исследования на более перспективных вариантах.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Cancer Observatory (GCO). IARC, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon CEDEX 08, France, 2021. Режим доступа: <https://gco.iarc.fr/>
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2020 году / Ред. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2021. 239 с.
3. Carbone M., Arron S.T., Beutler B. et al. Tumor predisposition and cancer syndromes as models to study gene X environment interactions // *Nat. Rev. Cancer*. 2020. V. 9. № 20. P. 533–549. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0265-y>
4. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): Review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis // *Breast Cancer*. 2021. V. 28. № 6. P. 1167–1180. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01148-2>
5. Garavand A.L., Mohammadi M., Mohammadzadeh S. Evaluation of *TP53* Codon 72, *P21* Codon 31, and *MDM2* SNP309 polymorphisms in Iranian patients with acute lymphocytic leukemia // *Rep. Biochem. Mol. Biol.* 2020. V. 9. № 1. P. 26–32. <https://doi.org/10.29252/rbmb.9.1.26>
6. Kamiza A.B., Kamiza S., Singini M.G., Mathew Ch.G. Association of *TP53* rs1042522 with cervical cancer in the sub-Saharan African population: A meta-analysis // *Trop. Med. Int. Health*. 2020. V. 25. № 6. P. 666–672. <https://doi.org/10.1111/tmi.13397>
7. Korobeinikova E., Ugenskiene R., Insodaite R. et al. The role of functional polymorphisms in oxidative stress-related genes on early-stage breast cancer survival // *Int. J. Biol. Markers*. 2021. V. 36. № 2. P. 14–21. <https://doi.org/10.1177/17246008211011177>
8. Zhang J., Zhang Y., Zhang Zh. Association of rs2279744 and rs117039649 promoter polymorphism with the risk of gynecological cancer // *Medicine (Baltimore)*. 2018. V. 97. № 2. P. e9554. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000009554>
9. Levine A.J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery // *Nat. Rev. Cancer*. 2020. V. 8. № 20. P. 471–480. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0262-1>
10. Hauge S., Macurek L., Syljuasen R.G. p21 limits S phase DNA damage caused by the Wee1 inhibitor MK1775 // *Cell Cycle*. 2019. V. 18. № 18. P. 834–847. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1593649>
11. MedCalc Software Ltd, 2021. Режим доступа: <https://www.medcalc.org/contact/>
12. Zhang A., Shi T., Zhao Y. et al. No association between *TP53 Arg72Pro* polymorphism and ovarian cancer risk: Evidence from 10113 subjects // *Oncotarget*. 2017. V. 68. № 8. P. 112761–112769. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22603>
13. Dholariya S., Mir R., Zuberi M. et al. Potential impact of (rs 4645878) BAX promoter –248G>A and (rs1042522) *TP53 72Arg>Pro* polymorphisms on epithelial ovarian cancer patients // *Clin. Transl. Oncol.* 2016. V. 18. № 1. P. 73–81. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1338-3>
14. Gansmo L.B., Bjornslett M., Halle M.K. et al. *MDM2* promoter polymorphism del1518 (rs3730485) and its impact on endometrial and ovarian cancer risk // *BMC Cancer*. 2017. V. 17. № 1. P. 97. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3094-y>

Association of Polymorphic Markers of the *TP53*, *MDM2*, and *CDKN1A* Genes with the Risk of Ovarian Cancer

P. K. Brenner^a, M. A. Kapralova^a, D. S. Khodyrev^b, S. V. Khokhlova^c, G. N. Khabas^c,
A. V. Asaturova^c, Yu. V. Nosova^c, L. N. Kayumova^d, and T. M. Zavarykina^{a, *}

^aEmanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^bFederal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, 115682 Russia

^cKulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, 117198 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119435 Russia

*e-mail: tpalievskaya@yandex.ru

The distribution of allele frequencies of polymorphic markers of genes of the apoptosis and cell cycle control system *TP53* (rs1042522), *MDM2* (rs2279744), and *CDKN1A* (rs1801270) was obtained. The relationship of studied markers with the risk of ovarian cancer was analyzed. The study included 70 healthy female donors and 66 ovarian cancer patients. DNA was isolated from the blood of healthy donors and ovarian tumor tissues. The polymorphic markers were determined by real-time PCR with fluorescent allele-specific probes. The odds ratios (OR) of ovarian cancer risk were obtained: for the allele of the *Pro* marker *Arg72Pro* of the *TP53* gene OR = 0.94, 95% CI = 0.57–1.65, $p = 1.0$; for the allele of the *G* marker *T(–410)G* of the *MDM2* gene OR = 0.96, 95% CI = 0.49–1.89, $p = 0.90$; for the *Arg* allele of the *Ser31Arg* marker of the *CDKN1A* gene OR = 1.53, 95% CI = 0.76–3.09, $p = 0.29$. For these markers, the results indicating the absence of association with ovarian cancer were obtained. It was revealed that the carriage of minor alleles of the *Arg72Pro* marker of the *TP53* gene, *T(–410)G* marker of the *MDM2* gene and *Ser31Arg* of the *CDKN1A* gene did not affect the risk of ovarian cancer in residents of the Moscow region.

Keywords: ovarian cancer, polymorphic marker, cell cycle control, apoptosis.