

Ж.Т. Исакова¹, Э.Т. Талайбекова¹, Н.М. Букуев², К.Б. Макиева², Д.А. Асамбаева¹,
А.А. Алдашев¹

У женщин кыргызской национальности с папилломавирусной инфекцией полиморфный маркер Arg72Pro гена P53 ассоциирован с развитием рака шейки матки

¹Институт молекулярной биологии и медицины,

²Национальный центр онкологии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек

Цель исследования. Изучить ассоциацию полиморфного маркера Arg72Pro гена P53 с развитием рака шейки матки (РШМ) у женщин кыргызской национальности.

Материалы и методы. В исследование было включено 204 женщины кыргызской национальности. Из них 102 женщины (средний возраст 53,5±10 года) с гистологически подтвержденным диагнозом РШМ и 102 — группа контроля (средний возраст 46,5 ± 8,5 года). У 88% (90/102) женщин с РШМ был обнаружен вирус папилломы человека (ВПЧ). При этом у 17% женщин (15/90) идентифицирован ВПЧ 16 типа, у 48% (43/90) — 18 тип, у 35% (32/90) — ВПЧ обоих типов (16/18). ДНК ВПЧ 16 и 18 типов определялась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Генотипы полиморфизма Arg72Pro гена P53 идентифицировали методом ПЦР-ПДФ.

Результаты. Сравнительный анализ полученных данных показал отсутствие значимых отличий в распределении частот генотипов и аллелей полиморфного локуса Arg72Pro гена P53 в общей группе женщин с РШМ и в контрольной группе ($\chi^2=1,24$, $p=0,54$). Однако при выделении группы женщин с РШМ, ассоциированного с ВПЧ, частота встречаемости аллеля Arg72 и гомозиготного генотипа Arg72Arg была выше, чем в группе контроля ($\chi^2=7,25$; $p=0,027$ для генотипов, $\chi^2=6,83$; $p=0,009$ для аллелей). У ВПЧ-положительных женщин генотип Arg72Arg гена P53 увеличивал вероятность развития рака РШМ в 1,85 раз (OR=1,85 [1,03-3,32]; $p=0,027$), а аллель Arg72 — 1,94 раза (OR=1,94 [1,20-3,15]; $p=0,009$).

Заключение. Генотип Arg72Arg и аллель Arg72 гена P53 у ВПЧ-положительных женщин кыргызской национальности ассоциирован с РШМ.

Ключевые слова: ген P53, Arg72Pro, полиморфизм, рак шейки матки, кыргызская популяция

Рак шейки матки (РШМ) — остается одним из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин. По данным ВОЗ 70-80% случаев РШМ встречается в развивающихся странах [23]. Проблема РШМ существует и в Кыргызской Республике, где стандартизированный показатель заболеваемости раком шейки матки в 2014 г. составил 12,14 на 100 тыс. женщин [1]. Отличительной чертой РШМ в Кыргызстане является омоложение и запущенность опухолевого процесса. В республике в последние годы наблюдается рост заболеваемости РШМ среди женщин до 40 лет. В 83,9% случаях РШМ выявляется на II-III стадии, что является неблагоприятным фактором в лечении [1].

Среди этиологических факторов, приводящих к развитию РШМ, решающую роль играет вирус папилломы человека (ВПЧ), особенно высоко-онкогенные 16 и 18 типы, ДНК которых способна интегрироваться в геном эпителиальных клеток [5]. Процесс интеграции вирусного генома с геномом клетки хозяина заканчивается образованием новых клеток с повышенной пролиферативной активностью [5].

В организме существуют механизмы противоопухолевой защиты, обеспечивающие стабильность генома и p53 является одним из главных протеинов этой системы [8]. Белок p53 участвует в системе, которая путем репарации ДНК и апоптоза восстанавливает поврежденные участки ДНК и сохраняет стабильность генома [8, 21]. При изменении структуры и нарушении функции p53 увеличивается вероятность развития злокачественных новообразований, в том числе и РШМ [10, 15, 17, 18].

Изменение структуры и функции белка p53 связано с полиморфизмом Arg72Pro экзона 4 (rs1042522 G>C) гена P53, который локализован на 17 хромосоме в локусе 17p13 [14]. В ряде исследований показана ассоциация вариантов полиморфного локуса Arg72Pro гена p53 с развитием РШМ у ВПЧ-инфицированных женщин [3, 6, 9, 10, 11, 15, 27, 21].

Целью настоящего исследования было изучить ассоциацию вариантов полиморфного маркера Arg72Pro гена *P53* с развитием РШМ у ВПЧ-позитивных женщин кыргызской национальности.

Материалы и методы

В исследование включено 204 женщины кыргызской национальности. В основную группу вошли 102 женщины (средний возраст 53,5±10 года) с гистологически подтвержденным диагнозом РШМ и находившиеся на стационарном лечении в отделении гинекологии Национального центра онкологии г. Бишкека в 2014–2015гг. У 88% (90/102) женщин с РШМ был обнаружен ВПЧ 16 и 18 типов. У 17% женщин (15/90) обнаружен 16 тип ВПЧ, у 48% (43/90) — 18 тип, у 35% (32/90) — обнаружен ВПЧ обоих типов (16/18). ДНК ВПЧ 16 и 18 типов определялась методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (набор реагентов «АмплиСенс, ВПЧ 16/18-FL», Москва, Россия). Контрольную группу составили 102 условно здоровых женщин кыргызской национальности (средний возраст 46,5 ± 8,5 года).

До начала обследования женщины с РШМ и контрольной группы были ознакомлены с целью работы и подписали добровольное письменное согласие на русском или кыргызском языках на проведение молекулярно-генетических исследований. Протокол исследования соответствовал этическим стандартам и был одобрен комитетом по биоэтике Национального центра онкологии МЗ Кыргызской Республики.

Для генотипирования использовались образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической крови. Для амплификации полиморфного локуса Arg72Pro гена *P53* использовали праймеры: прямой 5' TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA — 3', обратный 5' TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC— 3'. После амплификации для расщепления ПЦР-продуктов использовали эндонуклеазу BstUI. Продукты ПЦР разделялись путем электрофореза в 3 %-м агарозном геле и визуализировались в ультрафиолетовом свете с помощью гель-документирующей системы GelDoc IT (UVP, Великобритания) (рис. 1).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакета программ GraphPad Prism v 5.04. Данные представлены в виде абсолютного числа больных с данным генотипом и процента от их количества в группе. Распределения частот генотипов теоретически ожи-

даемому равновесному распределению Харди-Вайнберга оценивали с помощью критерия χ^2 . Для сравнения частот аллелей и генотипов между группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Для оценки риска развития заболевания использовался показатель отношения шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI). Различия между группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Белок p53 является транскрипционным фактором и имеет несколько функционально-значимых доменов, благодаря которым он способен соединяться с другими генами, продукты которых, участвуя в процессах репарации ДНК и апоптоза, поддерживают стабильность генома [8].

В гене *P53*, кодирующем белок p53, выявлен полиморфный локус Arg72Pro, который определяет синтез двух вариантов белка p53, отличающихся между собой противоопухолевыми свойствами. Установлено, что аргинин (Arg72) — содержащий вариант p53, значительно быстрее индуцирует процессы апоптоза и, соответственно, лучше защищает клетки от злокачественной трансформации, по сравнению с пролин вариантом (72Pr), который менее активно инициирует апоптотические процессы, но более эффективно останавливает деление клеток в G1 фазе [7].

Целью нашего исследования было изучить у женщин кыргызской популяции ассоциацию полиморфного локуса Arg72Pro с развитием РШМ, в том числе, сочетающимся с вирусом папилломы человека 16 и 18 типов.

Распределение генотипов полиморфного локуса Arg72Pro гена *P53* у женщин с РШМ и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,019$; $p=0,88$ в группе с РШМ и $\chi^2=2,80$; $p=0,093$ в контрольной группе).

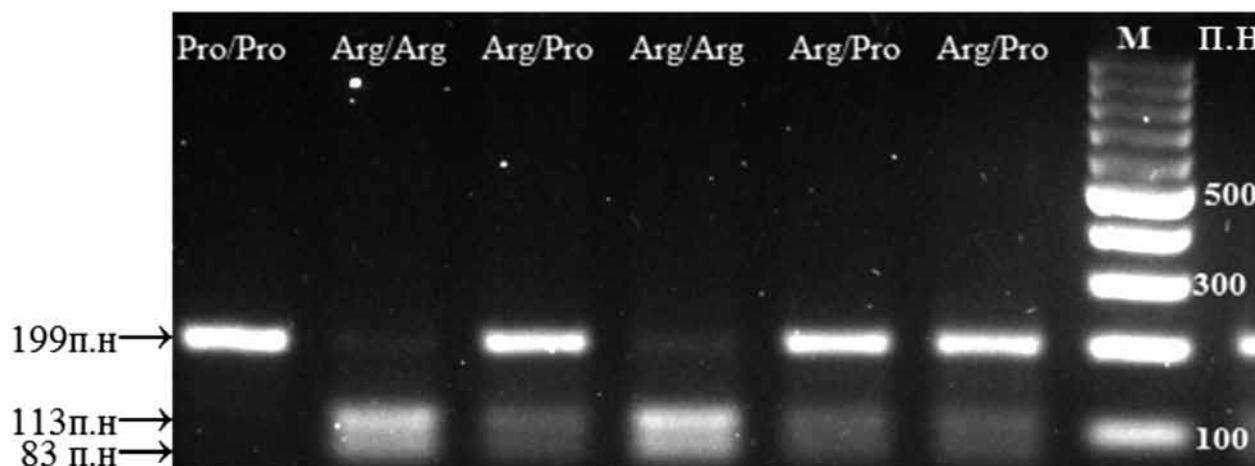


Рис. 1. Электрофорез полиморфного локуса Arg72Pro гена *P53* в 3% агарозном геле после обработки эндонуклеазой BstUI. Генотип Pro/Pro –199 п.н.; Arg/Pro –199,113 и 86 п.н.; Arg/Arg –113 и 86 п.н. М — маркер молекулярной массы ДНК с шагом 100 п.н.

Таблица 1. Распределение генотипов и аллелей полиморфизма Arg72Pro гена P53 у больных РШМ, ассоциированным с ВПЧ, и контрольной группы

Полиморфизм	Генотипы и аллели	РШМ с ВПЧ, n=90 (%)	Контроль, n=102 (%)	χ^2/p	OR (CI 95%)
Arg72Pro гена P53	Arg72Arg	60 (67)	53 (52)	7,25/0,027	1,85 (1,03-3,32)
	Arg72Pro	27 (30)	36 (35)		0,79 (0,43-1,44)
	Pro72Pro	3 (3)	13 (13)		0,24 (0,06-0,86)
	Arg72	147 (82)	142 (70)	6,83/0,009	1,94 (1,20-3,15)
	72Pro	33 (18)	62 (30)		0,51 (0,32-0,83)

Сравнительный анализ полученных данных показал отсутствие значимых отличий в распределении частот генотипов и аллелей полиморфного локуса Arg72Pro гена P53 в общей группе женщин с РШМ (Arg72Arg — 58%, Arg72Pro — 33%, Pro72Pro — 9%) и в контрольной группе (Arg72Arg — 52%, Arg72Pro — 35%, Pro72Pro — 13%) ($\chi^2= 1,24$, $p=0,54$). Однако при выделении группы женщин с РШМ, ассоциированного с ВПЧ, частота встречаемости аллеля Arg72 и гомозиготного генотипа Arg72Arg была статистически значимо выше, чем в группе контроля ($\chi^2=7,25$; $p=0,027$ для генотипов, $\chi^2=6,83$; $p=0,009$ для аллелей) (табл. 1). У ВПЧ-положительных женщин генотип Arg72Arg гена P53 увеличивал вероятность развития рака РШМ в 1,85 раз (OR=1,85 [1,03-3,32]; $p=0,027$), а аллель Arg72 — 1,94 раза (OR=1,94 [1,20-3,15]; $p=0,009$).

Таким образом, генотип Arg72Arg и аллель Arg72 гена P53 у ВПЧ-положительных женщин кыргызской национальности ассоциирован с РШМ.

Полученные нами результаты согласуются с данными ряда авторов, где показана ассоциация гомозиготного генотипа Arg72Arg и аллеля Arg72 с РШМ, ассоциированного с ВПЧ. Так, A. Storey и соавторы выявили, что женщины с генотипом Arg72Arg более чувствительны к ВПЧ-ассоциированным новообразованиям [21]. В частности, авторами было показано, что у женщин с генотипом Arg72Arg при наличии ВПЧ риск развития РШМ повышается почти в 7 раз.

H. Min-min et al. [15], исследуя группу женщин из Китая, выявили, что при инфицировании ВПЧ более высокий риск развития РШМ имеют женщины с генотипом Arg72Arg полиморфного маркера Arg72Pro гена P53, по сравнению с женщинами с генотипом Pro72Pro.

При исследовании женщин из Индии [20], Южной Африки [18] и Сантьяго [17] выявлено, что рак шейки матки статистически значимо чаще возникает у женщин с ВПЧ и с генотипом Arg72Arg.

По данным популяционных исследований, проведенных в европейских странах, в том числе Италии [6], Литве [9] и Германии [24], жен-

щины с генотипом Arg72Arg гена p53 при инфицировании ВПЧ статистически значимо чаще болели РШМ, чем женщины с двумя другими генотипами. В то же время имеются работы, где у ВПЧ-положительных женщин полиморфный локус Arg72Pro гена P53 не был ассоциирован с РШМ [13, 16, 19].

При анализе влияния географического фактора на популяционное распределение аллеля Arg72 гена P53 было выявлено уменьшение частоты встречаемости аллеля Arg72 в направлении с севера на юг и с запада на восток [2, 4]. Так, у ирландцев частота встречаемости аллеля Arg72 составила 0,88, итальянцев — 0,72, немцев — 0,63, русских — 0,65, в нашей выборке у кыргызов — 0,52, корейцев — 0,42, японцев — 0,44, евреев — 0,34, у жителей Южной Африки — 0,33 и Индии — 0,27 [2,4,12,16]. Таким образом, чем ближе к экватору, тем меньшей была частота встречаемости аллеля Arg72 гена P53. Данный фактор может играть важную роль при изучении особенностей распространения в отдельных популяциях некоторых онкологических заболеваний, ассоциированных с ВПЧ 16/18.

Результаты нашего и ряда других исследований показывают, что женщины с генотипом Arg72Arg более чувствительны к развитию РШМ, ассоциированного с ВПЧ 16 и 18 типов. Ассоциацию генотипа Arg72Arg гена P53 с РШМ, сочетающимся с ВПЧ, можно объяснить тем, что белок E6, синтезируемый ВПЧ, взаимодействует с p53 и вызывает его деградацию [22]. Это предотвращает апоптоз и способствует появлению клеток с новыми генетическими свойствами, способных к безудержной пролиферации. В экспериментальных исследованиях установлено, что E6 имеет повышенное сродство к Arg72 варианту p53, обладающему более высокой антипролиферативной активностью [7]. Данное обстоятельство позволяет объяснить высокую частоту встречаемости рака шейки матки, ассоциированному с папилломавирусной инфекцией, у женщин с генотипом Arg72Arg.

Учитывая широкую распространенность папилломавирусной инфекции среди женщин и доказанную этиологическую роль ВПЧ в развитии рака шейки матки, выявление группы лиц с ге-

нотипом высокого риска развития РШМ является важным, так как позволяет путем проведения среди данной категории лиц своевременной профилактической вакцинации против ВПЧ снизить риск развития РШМ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта (двойственности) интересов при написании данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Измайлова З.М., Макимбетов Э.К. Некоторые аспекты дескриптивной эпидемиологии при раке шейки матки у женщин в Кыргызской Республике // Вестник КРСУ. — 2014. — Т. 14 (10). — С. 121-124.
2. Сметанникова Н.А., Сметанникова М.А., Белявская В.А. и др. Опухлеассоциированный полиморфизм 72-го кодона гена p53: данные исследования долгожителей Новосибирской и Тюменской областей и мета-анализа // Сибирский Онкологический Журнал. — 2004. — Т. 2/3. — С. 124-129.
3. Arbel-Alon S., Menczer J., Feldman N. et al. Codon 72 polymorphism of p53 in Israeli Jewish cervical cancer patients and healthy women // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2002. — Vol. 12. — P. 741-744.
4. Brenna S.M., Silva I.D., Zeferino L.C. et al. Prevalence of codon 72 P53 polymorphism in Brazilian women with cervix cancer // Genetics and Molecular Biology. — 2004. — Vol. 27 (4). — P. 496-499.
5. Bruni L., Barrionuevo-Rosas L., Albero G. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World // Summary Report. — 2016-02-25.
6. Ciotti M., Coletti A., Giuliani L. et al. The p53 codon 72 arg/arg homozygous women in central Italy are at increased risk for HPV infections // Anticancer Res. — 2006. — Vol. 26. — P. 3745-3748.
7. Dumont Patrick., I-Ju Leu., Anthony C. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential // Nature Genetics. — 2003. — Vol. 33. — P. 357-365.
8. George Ph. P53 How crucial its role in cancer? // Int. J. Curr. Pharm. Res. — 2011. — Vol. 31 (2). — P. 1925.
9. Gudleviciene Z., Didziapetriene J., Ramael M. et. Human papillomavirus and p53 polymorphism in Lithuanian cervical cancer patients // Gynecol. Oncol. — 2006. — Vol. 102. — P. 530-533.
10. Jee S.H., Won S.Y., Yun J.E. et al. Polymorphism p53 codon- 72 and invasive cervical cancer: a meta- analysis // Int. J. Gynaecol. Obstet. — 2004. — Vol. 85. — P. 301-308.
11. Katiyar S., Thelma B.K., Murthy N.S. et al. Polymorphism of the p53 codon 72 Arg/Pro and the risk of HPV type 16/18-associated cervical and oral cancer in India // Mol Cell Biochem. — 2003. — Vol. 252 (1-2). — P. 117-124.
12. Kim J.W., Roh J.W., Park N.H. et al. Polymorphism of TP53 codon 72 and the risk of cervical cancer among Korean women // Am J. Obstet. Gynecol. — 2001. — Vol. 184. — P. 55-58.
13. Malcolm E.K., Baber G.B., Boyd J.C., Stoler M.H. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk // Modern Pathol. — 2000. — Vol. 13. — P. 373-378.
14. Matlashewski G.J., Tuck S., Pim D. et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53 // Mol Cell Biol. — 1987. — Vol. 7 (2). — P. 961-963.
15. Min-min H., Ming- rong X., Ze- yi C. et al. Analysis of p53 codon 72 polymorphism and its association with human papillomavirus 16 and 18 E6 in Chinese cervical lesions // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2006. — Vol. 16. — P. 2004-2008.
16. Nishikawa A., Fugimoto T., Akutagawa N. et al. P53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2000. — Vol. 10. — P. 402-407.
17. Ojeda J.M., Ampuero S., Rojas P. et al. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer // Biol. Res. — 2003. — Vol. 36. — P. 279-283.
18. Pegoraro R.J., Rom L., Lanning A. et al. p53 codon 72 polymorphism and human papillomavirus type in relation to cervical cancer in South African women // Int. J. Gynecol. Cancer. — 2002. — Vol. 12. — P. 383-388.
19. Rosenthal A.N., Ryan A., Al-Jehani R.M. et al. P53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK // Lancet. — 1998. — Vol. 352. — P. 871-872.
20. Saranth D., Khan Z., Tandle A.T. et al. HPV 16 /18 prevalence in cervical lesions/ cancers and p 53 genotypes in cervical cancer patients in India // Gynecol. Oncol. — 2002. — Vol. 86. — P. 157-162.
21. Storey A., Thomas M., Kalita A. et al. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer // Nature. — 1998. — Vol. 393. — P. 229-234.
22. Thomas M., Pim D., Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV // Oncogene. — 1999. — Vol.18. — P. 7690-7700.
23. World Cancer Report. World Health Organization. — 2014. pp. Chapter 5.12.
24. Zehbe I., Voglino G., Wilander E. et al. P53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development // Cancer Res. — 2001. — Vol. 61. — P. 608-611.

Поступила в редакцию 10.06.2016 г.

Zh.T. Isakova¹, E.T. Talaibekova¹, N.M. Bukuev²,
K.B. Makieva², D.A. Asambaeva¹, A.A. Aldashev¹

Polymorphism Arg72Pro of the P53 gene and the risk of human papillomavirus associated cervical cancer in women from Kyrgyz Republic

¹Institute of Molecular Biology and Medicine
²National Center of Oncology, Bishkek, Kyrgyz Republic

Aim. Allele frequency and genotype distribution in the cervical cancer group were compared with those of the control group to determine whether polymorphism Arg72Pro of P53 gene elevates the susceptibility of Kyrgyz women to cervical cancer (CC).

Materials and Methods. A total of 102 women (mean age 53,5±10 years) of Kyrgyz nationality with cervical cancer were

recruited into the study and 102 healthy women were used as the control group (mean age $46,5 \pm 8,5$ years). The diagnosis of cervical cancer was confirmed histologically. 88% (90/102) of women with cervical cancer were human papillomavirus (HPV) positive. 17% (15/90) specimens were positive for HPV type 16, 48% (43/90) were positive for HPV type 18 and 35% (32/90) were positive both HPV — 16/18. Presence of human papillomavirus DNA types 16 and 18 was analyzed by polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection. The Arg72Pro polymorphisms of the P53 gene were determined by the PCR-RFLP method.

Results. No significant difference was found between genotype distributions in the cervical cancer patients and the control group ($\chi^2=1,24$; $p=0,54$). However, the Arg72Arg genotype and Arg72 allele was significantly more frequent in women with cervical cancers infected with HPV than in the control group ($\chi^2=7,25$; $p=0,027$ for genotype, $\chi^2=6,83$; $p=0,009$ for allele). Women who are HIV positive and having the Arg72 allele had 1,94 fold (OR=1,94 [1,20-3,15]; $p=0,009$) higher risk of developing CC compared with subjects carrying neither of these alleles. HPV positive women carrying the genotype Arg72Arg had 1,85 fold (OR=1,85 [1,03-3,32]; $p=0,027$) higher risk of CC.

Conclusion. The Arg72Arg genotype of P53 gene in HIV positive women from Kyrgyz Republic may represent a potential risk factor for the development of cervical cancer.

Key words: Arg72Pro polymorphism, P53 gene, cervical cancer, Kyrgyz population