

И.В. Абраменко
Н.И. Белоус
А.А. Чумак
И.А. Крячок
З.В. Мартина
И.А. Филоненко

ПОЛИМОРФИЗМ rs6449182 ГЕНА CD38 И РИСК РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

ГУ «Научный центр
радиационной медицины
Национальной Академии
медицинских наук Украины»

Национальный институт
рака, Киев, Украина

Областная клиническая
больница, Полтава, Украина

Ключевые слова: хронический
лимфоцитарный лейкоз, риск
развития, полиморфизм rs6449182
гена CD38, генотип GG,
полимеразная цепная реакция.

Резюме. Цель исследования — определить риск развития хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) в зависимости от полиморфизма rs6449182 гена CD38. Обследовано 249 больных ХЛЛ и 238 лиц контрольной группы, совпадающих по возрасту и полу. Определение полиморфизма rs6449182 гена CD38 проводили методом полимеразной цепной реакции с рестрикцией продуктов реакции. Установлено, что среди больных ХЛЛ жителей сельской местности повышено число гомозигот полиморфной аллели гена (генотип GG — 24,4%) по сравнению с больными ХЛЛ городскими жителями (10,1%, $p = 0,006$) и контрольной группой (6,3%, $p = 0,0001$). Высказано предположение о возможной ассоциации полиморфизма rs6449182 гена CD38 с риском развития ХЛЛ в условиях контакта с негативными факторами сельскохозяйственного производства. Данных, свидетельствующих об ассоциации полиморфизма rs6449182 гена CD38 и риска развития ХЛЛ у городских жителей не обнаружено.

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) — одно из наиболее часто встречающихся онкогематологических заболеваний взрослого населения США и стран Европы, включая Украину. Случаи семейного ХЛЛ свидетельствуют о наличии определенной генетической предрасположенности к его развитию, однако до сих пор точные гены-мишени не идентифицированы [1]. Недавние исследования выявили ассоциацию риска заболевания ХЛЛ с наличием полиморфизма 10 генов; функции некоторых из них еще не известны [2].

В патогенезе ХЛЛ важная роль принадлежит молекуле поверхностных мембран лейкоэмических клеток — антигену CD38. Лигандом CD38 является молекула адгезии CD31/PECAM-1, присутствующая на эндотелии и некоторых типах стромальных клеток. Как результат взаимодействия CD38 с лигандом, на мембране лейкоэмических лимфоидных клеток индуцируется экспрессия антигена CD100, что способствует повышению их пролиферативной активности и, соответственно, экспансии лейкоэмического клона [3]. Кроме функции рецептора, молекула CD38 обладает также активностью фермента в реакциях образования аденозинтрифосфат рибозы (ADPR) и циклической аденозинтрифосфат рибозы (сADPR) из никотин-аденин-динуклеотида, а также фосфат-никотин-аденин-динуклеотидной кислоты из никотин-аденин-динуклеотида. сADPR — универсальный вторичный мессенджер при передаче внутриклеточного сигнала, способный контролировать уровень кальция в клетке независимо от инозитолтрифосфата и участвующий в процессах пролиферации клеток [4].

Ген CD38 располагается в области короткого плеча 4-й хромосомы (4p15), состоит из 8 экзонов, од-

нако более 98% нуклеотидных последовательностей представлено интронами [5]. Описаны 53 варианта полиморфизма гена CD38, обусловленных заменой одного нуклеотида (SNPs) [6]. Наиболее известным является SNP rs6449182 (184C > G, CD38 PvuII полиморфизм), локализованный в области 5' конца 1-го интрона в регуляторном участке, в непосредственной близости от CpG сайта функционального элемента, отвечающего за повышение экспрессии гена под влиянием ретиноевой кислоты. Кроме того, в составе данного участка гена находится так называемый E-бокс, с которым в В-лимфоцитах связывается фактор транскрипции E2A. Индукторами E2A являются ИЛ-2 и лиганды Toll-like рецептора-9 (TLR-9) (неметилированные CpG олигонуклеотидные последовательности бактерий). Установлено, что в присутствии G-аллели интенсивность связывания E2A выше, что приводит к более высокому уровню экспрессии антигена CD38 и свидетельствует о функциональном значении rs6449182 полиморфизма [7]. Ряд исследований свидетельствует о неблагоприятном течении ХЛЛ у носителей G-аллели гена CD38, что проявляется на момент установления диагноза как более поздняя стадия заболевания, более частое наличие гиперпластического синдрома, более высокий уровень лактатдегидрогеназы (непрямые показатели пролиферативной активности лейкоэмических клеток и массы опухоли), повышенный риск трансформации Рихтера [4, 8].

Вопрос о том, является ли носительство G-аллели гена CD38 фактором, предрасполагающим к развитию ХЛЛ, остается открытым. В исследованиях итальянских авторов распределение генотипов гена CD38 по полиморфизму rs6449182 среди больных

ХЛЛ не отличалось от контрольной группы [8], тогда как польские исследователи выявили уменьшение числа лиц с генотипом *CC* среди больных ХЛЛ и, соответственно, повышение риска развития заболевания у носителей полиморфной аллели: относительный риск (OR) становится 3,57 (95% доверительный интервал (ДИ) 2,4–5,3) [9]. Подобные исследования в нашей стране не проводились. В этой связи нами предпринята попытка проанализировать распределение генотипов гена *CD38* среди больных ХЛЛ жителей Украины с целью оценки риска развития этого заболевания в зависимости от полиморфизма rs6449182 гена *CD38*.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследовано 249 больных ХЛЛ В-клеточной природы (168 (67,5%) мужчин и 81 (32,5%) женщину, средний возраст которых — 57,47 ± 0,61 года), находившихся на лечении в отделении гематологии Института клинической радиологии ГУ «Научный центр радиационной медицины Национальной Академии медицинских наук Украины» («НЦРМ НАМН Украины») и Полтавской областной клинической больницы. Диагноз устанавливали на основании клинико-гематологических данных и иммунофенотипирования (в лаборатории иммуноцитологии Института клинической радиологии ГУ «НЦРМ НАМН Украины» под руководством доктора медицинских наук, профессора Д.А. Базыки) лимфоцитов периферической крови. Стадию заболевания определяли согласно классификаций К.Р. Rai и соавторов [10] и J.L. Vinet и соавторов [11]. По классификации Vinet 76 больных (30,5%) на момент проведения исследования находились на стадии А, 106 (42,2%) — на стадии В, 68 (27,3%) — на стадии С. По классификации Rai распределение пациентов было следующим: 0 стадия — 15 больных (6,0%), I стадия — 57 (22,9%), II стадия — 108 (43,3%), III стадия — 31 (12,4%) и IV стадия — 38 (14,3%). Мутационный статус генов варибельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGHV) был определен у 237 больных: в 164 (69,2%) случаях лейкоэмические клетки имели немутированные (UM), в 73 (30,8%) — мутированные (M) IGHV-гены. Определение проводили, как описано ранее [12].

В контрольную группу входило 238 человек, жителей города Киева и Киевской области без наличия онкологических и онкогематологических заболеваний: 163 (68,5%) мужчин и 75 (31,5%) женщин, средний возраст которых — 62,28 ± 0,67 года. Контрольная группа и группа больных ХЛЛ совпадали по полу обследованных ($p = 0,438$) и находились в одной возрастной категории.

Определение полиморфизма rs6449182 гена *CD38* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией полученных продуктов согласно Е. Ferrero и соавторов [5] (рис. 1). Полученную частоту полиморфизмов анализировали на соответствие уравнению Харди — Вайнберга. Различия в наблюдаемых и ожидаемых частотах генотипов считали значимыми при условии значения критерия $\chi^2 > 3,85$. Статистическую обработку данных проводили в программе SPSS 13.0 software package (SPSS, США).

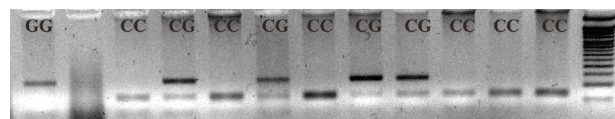


Рис. 1. Результаты определения полиморфизма rs6449182 гена *CD38* методом ПЦР с последующей рестрикцией полученных продуктов рестриктазой *RvuII* (CAG↓CTG). В отсутствие полиморфизма (генотип *CC*) образуется 2 полосы рестриктированного продукта реакции (63 и 65 п.о.). При наличии полиморфизма (генотип *GG*) рестрикция продукта не происходит (128 п.о.). Гетерозиготный вариант (генотип *CG*) проявляется наличием трех полос (128, 65 и 63 п.о.)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение генотипов rs6449182 гена *CD38* в контрольной группе соответствовало уравнению Харди — Вайнберга, не различалось в зависимости от пола обследованных и места их постоянного проживания. В то же время в группе больных ХЛЛ полученные частоты отдельных генотипов значительно отличались от ожидаемых за счет снижения числа гетерозигот и повышения числа гомозигот полиморфной аллели гена (табл. 1, 2). При этом частота носителей полиморфной аллели была одинаковой в обеих группах ($p = 0,342$).

Таблица 1

Распределение генотипов rs6449182 гена *CD38*, частота полиморфной аллели и соответствие уравнению Харди — Вайнберга (показатель χ^2) в сравнении с данными литературы

Группы обследованных лиц	Генотипы гена <i>CD38</i> , n (%)			Частота полиморфной аллели	χ^2
	CC	CG	GG		
Контрольная группа, n = 238	122 (51,3)	101 (42,4)	15 (6,3)	0,28	0,97
Больные ХЛЛ, n = 249	136 (54,6)	75 (30,1)	38 (15,3)	0,3	20,53
Распределение генотипов rs6449182 гена <i>CD38</i> в других контрольных группах					
Испания, n = 194 [13]	103 (53)	78 (40)	13 (7)	0,270	0,12
Ирландия, n = 630 [14]	403 (64)	189 (30)	38 (6)	0,210	5,91
Италия, n = 232 [8]	144 (62)	78 (34)	10 (4)	0,210	0,02
Италия, n = 232 [5]	162 (70)	60 (26)	10 (4)	0,170	2,04
Польша, n = 249 [9]	181 (72,7)	59 (23,7)	9 (3,6)	0,155	2,18
Польша, n = 254 [9]	181 (71,3)	69 (27,2)	4 (1,6)	0,152	0,8
Распределение генотипов rs6449182 гена <i>CD38</i> в других группах больных ХЛЛ					
Польша, n = 252 [9]	104 (41,3)	121 (48,0)	27 (10,7)	0,35	0,88
Польша, n = 208 [9]	74 (35,6)	113 (54,3)	21 (10,1)	0,37	5,46
Италия, n = 248 [8]	154 (62)	84 (34)	10 (4)	0,21	0,12

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Среди больных ХЛЛ распределение генотипов не зависело от пола пациентов, стадии заболевания при установлении диагноза, однако существенно различалось в зависимости от места проживания пациентов (см. табл. 2).

Таблица 2
Распределение генотипов rs6449182 гена CD38 в контрольной группе и среди больных ХЛЛ в зависимости от пола, места проживания, стадии заболевания и мутационного статуса IGHV-генов (для больных ХЛЛ)

Характеристики	CD38-генотип, n (%)			p
	CC	CG	GG	
Контрольная группа				
Пол: мужчины, n = 163	81 (49,7)	69 (42,3)	13 (8,0)	0,280
женщины, n = 75	41 (54,7)	32 (42,7)	2 (2,7)	
Жители городов, n = 209	105 (50,2)	91 (43,5)	13 (6,2)	0,651
Жители сел, n = 29	17 (58,6)	10 (34,5)	2 (6,9)	
Больные ХЛЛ				
Пол: мужчины, n = 168	94 (56,0)	50 (29,8)	24 (14,3)	0,774
женщины, n = 81	42 (51,9)	25 (30,9)	14 (17,3)	
Жители городов, n = 159	89 (56,0)	54 (34,0)	16 (10,1)	0,006
Жители сел, n = 90	47 (52,2)	21 (23,3)	22 (24,4)	
Стадия по Binet: A, n = 120	69 (57,5)	36 (30,0)	15 (12,5)	0,406
B, n = 91	51 (56,0)	24 (26,4)	16 (17,6)	
C, n = 38	16 (42,1)	15 (39,5)	7 (18,4)	0,566
Стадия по Rai: 0, n = 20	10 (50,0)	8 (40,0)	2 (10,0)	
I, n = 97	57 (58,8)	28 (28,9)	12 (12,4)	0,018
II, n = 93	53 (57,0)	23 (24,7)	17 (18,3)	
III, n = 28	11 (39,3)	12 (42,9)	5 (17,9)	0,018
IV, n = 11	5 (45,5)	4 (36,4)	2 (18,2)	
IGHV-гены: M, n = 73	32 (43,8)	31 (42,5)	10 (13,7)	0,018
UM, n = 164	98 (59,8)	40 (24,4)	26 (15,9)	

Среди больных ХЛЛ жителей Киева и других городов распределение генотипов rs6449182 гена CD38 соответствовало распределению Харди — Вайнберга ($\chi^2 = 3,09$) и приближалось к показателям в контрольной группе ($p = 0,141$), тогда как среди жителей сельской местности соответствия с уравнением Харди — Вайнберга не было найдено ($\chi^2 = 21,99$), распределение отличалось от такового в контроле ($p = 0,000007$), а также у больных ХЛЛ городских жителей. Основное различие между подгруппами больных ХЛЛ в зависимости от места проживания заключалось в частоте встречаемости генотипа GG. При этом различий по возрасту, полу, стадии заболевания между больными ХЛЛ городскими жителями и жителями сельской местности не было (табл. 3).

Таблица 3
Сравнительная характеристика больных ХЛЛ в зависимости от места постоянного проживания

Показатель	Место постоянного проживания		p
	Городские жители, n (%)	Жители сельской местности, n (%)	
Пол: мужчины, n = 168	108 (67,8)	60 (66,7)	0,839
женщины, n = 81	51 (32,1)	30 (33,3)	
Стадия по Binet: A, n = 76	51 (32,0)	25 (27,8)	0,816
B, n = 105	68 (42,8)	37 (41,1)	
C, n = 68	40 (25,2)	28 (31,1)	0,658
Стадия по Rai: 0, n = 15	9 (5,7)	6 (8,7)	
I, n = 57	38 (23,9)	19 (21,1)	0,886
II, n = 108	71 (44,7)	37 (41,1)	
III, n = 31	17 (10,7)	14 (15,6)	0,635
IV, n = 38	24 (15,1)	14 (15,6)	
IGHV-гены: M, n = 73	47 (31,1)	26 (30,2)	0,886
UM, n = 164	104 (68,9)	60 (69,8)	
Возраст, годы	57,25 ± 0,81	57,86 ± 0,93	0,635

Это свидетельствует о том, что повышение числа гомозигот GG среди больных ХЛЛ жителей сельской местности не обусловлено селекцией пациентов. Соответственно, риск развития ХЛЛ у жителей сельской местности, гомозигот полиморфной аллели

гена CD38 по сравнению с контрольной группой был повышен: OR = 4,80 (95% ДИ 2,36–9,78, $p = 0,0001$).

Как видно из данных табл. 2, выявлена ассоциация распределения исследованных генотипов с мутационным статусом IGHV-генов, однако различия в частоте гомозигот GG среди больных ХЛЛ жителей города и сельской местности не обусловлены этим фактом, поскольку по мутационному статусу IGHV-генов в лейкоэмических клетках подгруппы больных совпадали (см. табл. 3). Кроме того, повышение числа гомозигот GG наблюдалось среди больных ХЛЛ жителей сельской местности как при M, так и UM статусе IGHV-генов (рис. 2).

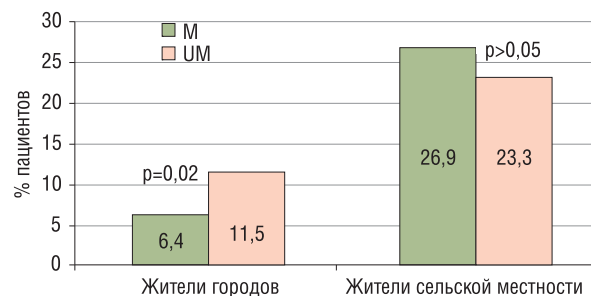


Рис. 2. Частота генотипа GG среди пациентов с M и UM IGHV-генами в лейкоэмических клетках в зависимости от места их постоянного проживания

Анализ результатов других исследователей по обследованию лиц контрольных групп показал значительные различия в частоте отдельных генотипов между группами; наибольшее соответствие выявлено между группой, обследованной нами, и испанской популяцией ($p = 0,904$). При сравнении результатов, полученных нами при исследовании группы больных ХЛЛ, с данными литературы показано, что распределение генотипов гена CD38 среди больных ХЛЛ городских жителей приближалось к показателям в группе больных ХЛЛ жителей Италии ($p = 0,052$).

Эпидемиологические исследования свидетельствуют, что лица, занимающиеся профессиональной деятельностью в области сельского хозяйства и животноводства, имеют повышенный риск развития ХЛЛ [15]. К примеру, повышенный риск развития ХЛЛ и неходжкинских злокачественных лимфом низкой степени злокачественности у фермеров (OR = 1,79, 95% ДИ 1,22–2,63) обнаружен в исследовании D. Amadori и соавторов [16], что авторы связывают с использованием химических веществ для обработки растений и животных и/или влиянием трансмиссивных заболеваний животных. В исследовании D.C. Chiu и соавторов [17] повышение риска развития ХЛЛ/лимфом из малых лимфоцитов найдено у лиц, использовавших пестициды, особенно если они имели близких родственников, заболевших злокачественными заболеваниями системы крови, что предполагает наличие определенной генетической предрасположенности. В этой связи нами сделано предположение, что, возможно, гомозиготы полиморфной аллели rs6449182 гена CD38

имеют повышенный риск развития ХЛЛ в условиях контакта с негативными факторами сельскохозяйственного производства. Данное предположение носит предварительный характер и нуждается в подтверждении глубоким эпидемиологическим исследованием, предполагающим учет и анализ комплекса негативных факторов окружающей среды, воздействующих на организм. В то же время данных, свидетельствующих об ассоциации полиморфизма rs6449182 гена *CD38* и риска развития ХЛЛ у городских жителей, нами не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goldin LR, Landgren O, Marti GE, Caporaso NE. Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas. *European J Clin Med Oncol* 2010; **2** (1): 119–26.
2. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nature Genetics* 2010; **42** (2): 132–59.
3. Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, et al. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 2005; **105** (8): 3042–50.
4. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, et al. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 2011; **118** (13): 3470–8.
5. Ferrero E, Saccucci F, Malavasi F. The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene. *Immunogenetics* 1999; **49** (4): 597–604.
6. Hartman WR, Pellemounter LL, Moon I, et al. CD38 expression, function, and gene resequencing in a human lymphoblastoid cell line-based model system. *Leuk Lymphoma* 2010; **51** (7): 1315–25.
7. Saborit-Villarroya I, Vaisitti T, Rossi D, et al. E2A is a transcriptional regulator of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011; **25** (3): 479–88.
8. Aydin S, Rossi D, Bergui L, et al. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood* 2008; **111** (12): 5646–53.
9. Jamrozik K, Szmraj Z, Grzybowska-Izydorczyk O, et al. CD38 gene polymorphisms contribute to genetic susceptibility to B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence from two case-control studies in Polish Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; **18** (3): 945–53.
10. Rai KR, Sawitzky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; **46** (2): 219–34.
11. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; **48** (1): 198–205.
12. Abramenko I, Bilous N, Chumak A, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident — with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis *Leukemia Res* 2008; **32** (4): 535–42.

13. Gonzalez-Escribano MF, Aguilar F, Torres D, et al. CD38 polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2004; **65** (5): 660–4.

14. Drummond FJ, Mackrill JJ, O'sullivan K, et al. CD38 is associated with premenopausal and postmenopausal bone mineral density and postmenopausal bone loss. *J Bone Miner Metab* 2006; **24** (1): 28–35.

15. Linet MS, Devesa SS, Morgan GJ. The leukemias. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention* (3rd ed). New York: Oxford University Press, 2006: 841–71.

16. Amadori D, Nanni O, Falcini F, et al. Chronic lymphocytic leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas by histological type in farming-animal breeding workers: a population case-control study based on job titles. *Occup Environ Med* 1995; **52** (6): 374–9.

17. Chiu DC, Weisenburger DD, Zahm SH, et al. Agricultural pesticide use, familial cancer, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13** (4): 525–31.

RS6449182 CD38 GENE POLYMORPHISM AND THE RISK OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA DEVELOPMENT

I.V. Abramenko, N.I. Bilous, A.A. Chumak,
I.A. Kryachok, Z.V. Martina, I.A. Filonenko

Summary. The aim of paper is evaluate the risk of chronic lymphocytic leukemia (CLL) depend on rs6449182 CD38 gene polymorphism. It was observed 249 CLL patients and 238 age- and sex-matched controls. rs6449182 CD38 gene polymorphism was determined by polymerase chain reaction with restriction of reaction products. The number of polymorphic allele homozygotes (GG genotype) was increased in subgroup of rural CLL patients (24,4%) comparing with urban CLL patients (10,1%, $p = 0,006$) and controls (6,3%, $p = 0,0001$). The assumption was made concerning a possible association of rs6449182 CD38 gene polymorphism and the risk of CLL under influence of negative agricultural factors. On the other hand, no data of association of rs6449182 CD38 gene polymorphism and the CLL risk in urban CLL patients found.

Key Words: chronic lymphocytic leukemia, risk of development, rs6449182 CD38 gene polymorphism, GG genotype, polymerase chain reaction.

Адрес для переписки:

Абраменко И.В.
03115, Киев, просп. Победы, 119/121
ГУ «Научный центр радиационной медицины
Национальной Академии медицинских наук
Украины»