

МЩУК Я.М.¹, ХАРКІВСЬКА Є.В.¹, СЕРГА С.В.¹, ШКЛЯР С.Є.¹, СТАХОВСЬКИЙ О.Е.²,
СТАХОВСЬКИЙ Е.О.², ВІТРУК Ю.В.², КОНОНЕНКО А.А.², ДЕМИДОВ С.В.¹,
ОСТАПЧЕНКО Л.І.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.^{1✉}

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: slavamishchuk@gmail.com

² Національний інститут раку,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Ломоносова, 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

✉ iryna.kozeretcka@gmail.com, (044) 522-39-95

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ARG72PRO ГЕНА TP53 (RS1042522) З РИЗИКОМ РОЗВИТКУ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА В УКРАЇНІ

Мета. Визначити частоту поліморфних варіантів гена TP53 серед хворих на рак сечового міхура (PCM) та перевірити можливу асоціацію поліморфізму з ризиком раку. **Методи.** Генотипи в 72 кодоні гена TP53 визначали методом ПЛР із використанням алель-специфічних праймерів. Поліморфізм визначали у 114 хворих із діагнозом карцинома сечового міхура. Продукти ПЛР розділяли шляхом електрофорезу у 3% агарозному гелі. **Результати.** Розподіл генотипів становив: Arg/Arg – 59,6 % (n=68), Arg/Pro – 40,4% (n=46), Pro/Pro – 0% (n=0). Частоти генотипів серед хворих ($\chi^2=7,28$, $p=0,0007$) не відповідали розподілу Харді-Вайнберга. Частоти генотипів значно відрізнялися між групою хворих та таким в популяції України. У групі хворих PCM спостерігається більша частота генотипу Arg/Arg ($F = 42,7$, $p < 0,05$) і менша частота Arg/Pro ($F = 40,9$, $p < 0,05$) у порівнянні з контролем. **Висновки.** Отримані нами дані дозволяють припустити, що генотип Arg/Arg асоційований із підвищеним ризиком розвитку раку сечового міхура в Україні (OR = 5,6, 95 % CI = 3,19 до 9,34, $p < 0,0001$).

Ключові слова: ген TP53, рак сечового міхура, поліморфізм Arg72Pro, популяція України.

Канцерогенез сечового міхура – комплексний, мультифакторний процес, який зумовлюється сукупністю генетичних, екологічних та поведінкових чинників. Тютюнопаління, контакт із хімічними речовинами, бактеріальні та вірусні інфекції вважаються безпосередньо асоційованими з раком сечового міхура (PCM) [1], тоді як спадкові фактори можуть визначати схильність до розвитку PCM [2].

TP53 є одним із ключових генів-супресорів пухлин. Він локалізований у регіоні 17p13, який часто виявляється делетованим у ракових клітинах. Продуктом гена є білок p53, або так званий «вартовий геному». p53 – це транскрипційний фактор, який залежно від наявності стимулу та ступеня пошкодження ДНК, або зумовлює зупинку клітинного циклу, або запускає апоптоз [3–5].

Близько 30 років тому на основі відмінностей в електроферетичній мобільності білка p53 була відкрита нова структурна форма TP53, яка сприяла розвитку ідеї щодо ролі однонуклеотидних поліморфізмів (SNP) у процесах канцерогенезу. Відмінності в рухливості білка були зумовлені поліморфізмом Arg72Pro (rs1042522), локалізованим у 72 кодоні гена TP53, який спочатку розглядався як нормальна генетична варіація без жодного впливу на канцерогенез. Однак це твердження поступово спростовувалося з накопиченням даних щодо асоціації поліморфізму 72 кодона з розвитком раку [6].

Поліморфізм 72 кодона гена TP53 – це однонуклеотидний поліморфізм у 4 екзоні, що визначає кодування або аргініну (CGC), або проліну (CCC) [6]. Локалізуючись у пролін-збагаченому регіоні, він може впливати на структуру SH3-зв'язуючого домену [7], який є необхідним для індукції апоптозу [6]. Форми p53Arg та p53Pro характеризуються функціональними та структурними відмінностями [4]. Вважають, що p53Arg більш ефективний за супресії клітинної трансформації та індукції апоптозу, тоді як p53Pro – за індукції зупинки фази клітинного циклу G1 [8–10].

© МЩУК Я.М., ХАРКІВСЬКА Є.В., СЕРГА С.В., ШКЛЯР С.Є., СТАХОВСЬКИЙ О.Е.,
СТАХОВСЬКИЙ Е.О., ВІТРУК Ю.В., КОНОНЕНКО А.А., ДЕМИДОВ С.В.,
ОСТАПЧЕНКО Л.І., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

Останнім часом надходить все більше даних щодо асоціації Arg72Pro поліморфізму гена *TP53* зі схильністю до більшості типів раку, в тому числі раку сечового міхура [7], проте результати цих досліджень є суперечливими. Зокрема, асоціація генотипу Arg/Arg з підвищеним ризиком РСМ була показана Soultzis et al. [11] та Prescott et al. [12], тоді як Zhang et al. [13] продемонстрували асоціацію цього генотипу із зниженим ризиком. Дослідження Lin et al. [14] та Xu et al. [15] показують асоціацію генотипу Pro/Pro з підвищеним ризиком РСМ. Деякі інші дослідження [16, 17] демонструють відсутність будь-якої асоціації взагалі. Подібні результати, ймовірно, зумовлені відмінностями у поширенні алелів серед різних національностей [18], і тому встановлення реальної картини можливої асоціації в контексті етнічної приналежності потребує подальших широкомасштабних досліджень.

Матеріали і методи

У дослідження були залучені 114 людей із діагнозом карцинома сечового міхура віком від 28 до 76 років. Всі обстежувані є вихідцями і проживають на території України. Зразки для дослідження були надані з інформаційної згоди обстежуваних.

Виділення геномної ДНК проводили з периферійної крові за допомогою набору «ДНК-сорб В» («AmpliSens», Росія) за протоколом фірми-виробника.

Генотипи *TP53* в кодоні 72 були визначені за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням алелів специфічних праймерів: p53Pro+/p53- (p53Pro+: 5'GCCAGAGGCTGCTCCCC; p53-: 5'CGTGCAAGTCACAGACTT) – для Pro послідовності; p53+/Arg- (p53+: 5'TCCCCCTTGCCGTCCCAA; p53Arg-: 5'CTGGTGCAGGGGCCACGC) – для Arg послідовності [19]. Для кожної проби проводилося 2 реакції: перша з використанням p53Pro+/p53- пари праймерів; друга з використанням p53+/Arg- пари праймерів. Продуктом пролін специфічної ПЛР є фрагмент 177 п. о., тоді як аргінін специфічної ПЛР – 141 п. о.

ПЛР проводили за схемою, описаною в літературі [19], з деякими модифікаціями: денатурація 3 хв. за 95°C, 40 циклів (денатурація 40с/95°C, відпал праймерів 30 с/56°C, синтез 40с/72°C), заключний синтез 5 хв при 72 °C.

Реакція проводилась у суміші об'ємом 20 мкл (2,5 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10x ПЛР-буфера (10X DreamTaq Buffer, «Thermo Scientific»,

USA), 2 мкл 2 mM дНТФ («Thermo Scientific», USA), по 0,5 мкл 20 mM кожного праймера, 0,2 мкл Taq-полімерази (5 од. акт./мкл «Thermo Scientific», USA), 12,5 мкл дистильованої води).

Продукти реакції візуалізували у 3% агарозному гелі.

Відмінності між частотами алелів у різних групах розраховували з використанням критерію Фішера для якісних ознак [20]. Відповідність розподілів генотипів оцінювали за рівнянням Харді-Вайнберга (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>).

Результати та обговорення

Для 68 хворих був встановлений генотип Arg/Arg (59,6%), для 46 – Arg/Pro (40,4%), Pro/Pro виявлено не було. Частоти алелів становлять 80±3,7% та 20±3,7% для Arg та Pro відповідно. Розподіл генотипів у групі хворих РСМ не відповідає очікуваному рівноважним відповідно до рівняння Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 7,28$ $p = 0.007$).

Отриманий нами розподіл генотипів не відповідає рівновазі Харді-Вайнберга, проте відомо, що близько 10% досліджень генотип-фенотип асоціації демонструють відхилення від рівноважного стану [21]. Одним із можливих пояснень такого явища може бути відбір проти генотипу Pro/Pro, про який відомо, що він забезпечує стійкість до УФ-опромінення [4].

Для встановлення можливої асоціації поліморфізму Arg72Pro гена *TP53* ми порівняли частоти генотипів серед хворих з отриманими нами раніше даними для групи 148 умовно здорових українців [22]. Аналіз частот генотипів демонструє чітку різницю між контрольною групою та групою хворих РСМ. У групі хворих РСМ спостерігається більша частота генотипу Arg/Arg ($F = 42,7$, $p < 0,05$) і менша частота Arg/Pro ($F = 40,9$, $p < 0,05$) у порівнянні з контролем.

Отримані нами дані розподілу частот серед хворих раком сечового міхура та контрольною групою свідчать, що генотип Arg/Arg гена *TP53* асоційований із підвищеним ризиком розвитку раку сечового міхура серед представників населення України (OR = 5,6, 95% CI = 3,19 до 9,34, $p < 0,0001$).

Хворі РСМ були поділені на групи. Клінічні та гістопатологічні характеристики обстежуваної групи хворих залежно від генотипу 72 кодона гена *TP53* наведені в таблиці.

Таблиця. Клінічні та гістопатологічні характеристики

Клінічні характеристики		Генотип 72 кодона гена <i>TP53</i>		Загалом
		Arg/Arg	Arg/Pro	
Кількість		68	46	114
Стать	чол.	60	44	104
	жін.	8	2	10
Вік (років)	До 29	1	0	1
	30-39	1	2	3
	40-49	4	3	7
	50-59	26	13	39
	60-69	28	24	52
	70+	8	4	12
Тип РСМ	Інвазивний	54	40	94
	Неінвазивний	14	6	20
Ступінь злоякісності пухлини	G1	7	2	9
	G2	45	32	77
	G3	16	12	28
Ступінь поширення пухлини (за системою TNM)	T1	15	7	22
	T2	32	25	57
	T3	15	6	21
	T4	6	8	14
Тютюнопаління	Так	32	16	48
	Ні	36	30	66
Шкідливі умови праці	Так	15	7	22
	Ні	53	39	92
Випадки онкологічних захворювань у сім'ї	Так	9	9	18
	Ні	59	37	96

Поліморфізм Arg72Pro гена *TP53* активно вивчається щодо асоціації з ризиком розвитку раку сечового міхура. І хоча більшість досліджень демонструють асоціацію з підвищеним ризиком, проте є й такі, в яких не виявлено асоціації взагалі [16, 17]. Кілька досліджень показали, що поліморфізм Arg72Pro відіграє певну роль в інвазивності та прогресії [23, 24], з іншого боку, повідомлялося про асоціацію поліморфізму саме з прогресуванням, а не виникненням раку [25]. Мета-аналіз, проведений Z. Yang et al. [26], показав значну асоціацію між поліморфізмом Arg72Pro гена *TP53* та підвищеним ризиком розвитку раку сечового міхура в жителів Азії, але не в представників європеїдної раси.

Ці очевидні відмінності у ролі поліморфізму Arg72Pro в ризику розвитку раку у людей із

різних частин світу свідчать про те, що різні варіанти гена *TP53* в 72 кодоні можуть бути етнічно специфічними [27]. Саме тому визначення особливостей варіації 72 кодона в людей різних національностей є необхідним та має прогностичне значення, оскільки етнічна приналежність може зумовлювати унікальну комбінацію поліморфних ознак, які модифікують генетичну схильність до розвитку раку та відповідь організму на ліки та канцерогени.

Висновки

Аналіз частот поліморфних варіантів засвідчив асоціацію генотипу Arg/Arg гена *TP53* з підвищеним ризиком розвитку раку сечового міхура в Україні.

Література

1. Murta-Nascimento C., Schmitz-Drager B.J., Zeegers M.P., Steineck G., Kogevinas M., Real F.X., Malats N. Epidemiology of urinary bladder cancer: from tumor development to patient's death. *World J. Urol.* 2007. Vol. 25. P. 285–295. doi: 10.1007/s00345-007-0168-5.

2. McConkey D.J., Lee S., Choi W., Tran M., Majewski T., Siefker-Radtke A., Dinney C., Czerniak B. Molecular genetics of bladder cancer: emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol. Oncol.* 2010. Vol. 28. P. 429–440. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.04.008.
3. Pineda S., Milne R.L., Calle M.L., Rothman N., Lopez de Maturana E., Herranz J., Kogevinas M., Chanock S.J., Tardon A., Marquez M., Guey L.T., Garcia-Closas M., Lloreta J., Baum E., Gonzalez-Neira A., Carrato A., Navarro A., Silverman D.T., Real F.X., Malats N. Genetic variation in the TP53 pathway and bladder cancer risk: a comprehensive analysis. *PLoS One.* 2014. Vol. 9. P. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0089952.
4. Denisov E.V., Cherdyntseva N.V., Litviakov N.V., Malinovskaya E.A., Babyskhina N.N., Belyavskaya V.A., Voevoda M.I. TP53 gene polymorphism in cancer risk: the modulating effect of ageing, ethnicity and TP53 somatic abnormalities. In: Cheng Y, editor. *Tumor suppressor genes*. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. P. 79–110. URL: <http://www.intechopen.com/books/tumor-suppressor-genes/tp53-gene-polymorphisms-in-cancer-risk-the-modulating-effect-of-ageing-ethnicity-and-tp53-somatic-ab> (Last accessed: 27.02.2018).
5. Lin H.Y., Yang M.C., Huang C.H., Wu W.J., Yu T.J., Lung F.W. Polymorphisms of TP53 are markers of bladder cancer vulnerability and prognosis. *Urol Oncol.* 2013. Vol. 31. P. 1231–1241. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.11.031.
6. Lin H.Y., Huang C.H., Wu W.J., Chang L.C., Lung F.W. TP53 codon 72 Gene Polymorphism Paradox in Associated with Various Carcinoma Incidences, Invasiveness and Chemotherapy Responses. *Int J Biomed Sci.* 2008. Vol. 4. P. 248–254.
7. Khan M.H., Khalil A., Rashid H. Evaluation of the p53 Arg72Pro polymorphism and its association with cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Genet. Res. (Camb).* 2015. Vol. 97. P. 1–11. doi: 10.1017/S0016672315000075.
8. Dumont P., Leu J.I., Della Pietra A.C. 3rd, George D.L., Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003. Vol. 33. P. 357–365. doi: 10.1038/ng1093.
9. Pim D., Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer.* 2004. Vol. 108. P. 196–199. doi: 10.1002/ijc.11548.
10. Siddique M., Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene.* 2006. Vol. 25. P. 3489–3500. doi: 10.1038/sj.onc.1209405.
11. Soultizis N., Sourvinos G., Dokianakis D.N., Spandidos D.A. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett.* 2002. Vol. 179. P. 175–183.
12. Prescott J.L., Montie J., Pugh T.W., McHugh T., Veltri R.W. Clinical sensitivity of p53 mutation detection in matched bladder tumour, bladder wash, and voided urine specimens. *Cancer.* 2001. Vol. 91. P. 21–27.
13. Zhang R., Chen W., Zhang W., Jiang Q., Liu C., Lin Y., Hu Z., Yu S., Xu G. Genetic polymorphisms of p53 codon 72 and bladder cancer susceptibility: a hospitalbased case-control study. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2011. Vol. 15. P. 337–341. doi: 10.1089/gtmb.2010.0230.
14. Lin H.Y., Huang C.H., Yu T.J., Wu W.J., Yang M.C., Lung F.W. p53 codon 72 polymorphism was associated with vulnerability, progression, but not prognosis of bladder cancer in a Taiwanese population: an implication of structural equation modeling to manage the risks of bladder cancer. *Urol. Int.* 2011. Vol. 86. P. 355–360. doi: 10.1159/000323599.
15. Xu T., Xu Z.C., Zou Q., Yu B., Huang X.E. P53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk- meta-analysis evidence for a link in Asians but not Caucasians. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012. Vol. 13. P. 2349–2354.
16. Borkowska E., Traczyk M., Pietrusinski M., Matych J., Kaluzewski B. The significance of p53 gene codon 72 and 213 polymorphisms in urinary bladder cancer in Central Poland. *Cent. European J. Urol.* 2010. Vol. 63. P. 9–13.
17. Mabrouk I., Baccouche S., El-Abed R., Mokdad-Gargouri R., Mosbah A., Saïd S., Daoud J., Frikha M., Jlidi R., Gargouri A. No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. Vol. 1010. P. 764–770.
18. Jiang D.K., Ren W.H., Yao L., Wang W.Z., Peng B., Yu L. Meta-analysis of association between TP53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk *Urology.* 2010. Vol. 76. P. 765. doi: 10.1016/j.urology.2010.04.044.
19. Baek W.K., Cho J.W., Suh S.I., Suh M.H., Shin D.H., Cho C.H., Lee T.S., Cha S.D. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Korean women. *Korean Med. Sci.* 2000. Vol. 15. P. 65–67. doi: 10.3346/jkms.2000.15.1.65.
20. Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statistical methods in the biology. Horlovka: Likhtar. 2008. 248 s.
21. Trikalinos T.A., Salanti G., Khoury M.J., Ioannidis J.P. Impact of Violations and Deviations in Hardy-Weinberg Equilibrium on Postulated Gene-Disease Associations. *Am. J. Epidemiol.* 2006. Vol. 163. P. 300–309. doi: 10.1093/aje/kwj046.
22. Mishchuk Y.M., Serga S.V., Koliada O.K., Ostapchenko L.I., Demydov S.V., Kozeretska I.A. TP53 codon 72 polymorphic variants (Rs1042522) frequency in the Ukrainian population. *Problems of radiation medicine and radiobiology.* 2015. Vol. 20. P. 414–419.
23. Mabrouk I., Baccouche S., El-Abed R., Mokdad-Gargouri R., Mosbah A., Saïd S., Daoud J., Frikha M., Jlidi R., Gargouri A. No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci.* 2003. Vol. 1010. P. 764–770.
24. Soultizis N., Sourvinos G., Dokianakis D.N., Spandidos D.A. p53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett.* 2002. Vol. 179. P. 175–183.
25. Smith N.D., Rubenstein J.N., Eggen S.E., Kozlowski J.M. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol.* 2003. Vol. 169. P. 1219–1228. doi: 10.1097/01.ju.0000056085.58221.80
26. Yang Z., Nie S., Zhu H., Wu X., Jia S., Luo Y., Tang W. Association of p53 Arg72Pro polymorphism with bladder cancer: a meta-analysis. *Gene.* 2013. Vol. 512. P. 408–413. doi: 10.1016/j.gene.2012.09.085.
27. Siddique M., Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene.* 2006. Vol. 25. P. 3489–3500. doi: 10.1038/sj.onc.1209405

MISHCHUK Ya.M.¹, KHARKIVSKA Ye.V.¹, SERGA S.V.¹, SHKLYAR S.E.¹, STAKHOVSKIY O.E.², STAKHOVSKIY E.O.², VITRUK Yu.V.², KONONENKO A.A.², DEMYDOV S.V.¹, OSTAPCHENKO L.I.¹, KOZERETSKA I.A.¹

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and Medicine", Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64, e-mail: slavamishchuk@gmail.com

² National Cancer Institute, Ukraine, 03022, Kyiv, Lomonosova str., 33/43, e-mail: estakhovsky@yahoo.com

ASSOCIATION OF *TP53* ARG72PRO POLYMORPHISM (RS1042522) WITH BLADDER CANCER RISK IN THE UKRAINIAN POPULATION

Aim. To determine the frequency of *TP53* polymorphic variants in bladder cancer patients and define possible association of this polymorphism with a bladder cancer in Ukrainians patients. **Methods.** The genotypes of *TP53* gene at codon 72 were detected by PCR with allele specific primers. We investigated Arg72Pro polymorphism in 114 DNA samples of patients with bladder cancer. The PCR-amplified DNA products were subjected to electrophoresis in 3 % agarose. **Results.** The distribution of genotypes in group of patients with a bladder cancer was: Arg/Arg – 59.6 % (n=68), Arg/Pro – 40.4 % (n=46), Pro/Pro – 0 % (n=0). Genotype frequencies in patients ($\chi^2=7.28$, $p=0.0007$) weren't in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium. There were significant differences in the frequency of genotypes between the healthy individuals and the cancer group patients. Our result showed that patients with bladder cancer had a significantly higher frequency of Arg/Arg ($F=42.7$, $p<0.05$) and a lower frequency of Pro/Arg ($F=40.9$, $p<0.05$) compared to controls. **Conclusions.** Our study allows us to suggest that Arg/Arg polymorphic variant of *TP53* is associated with the higher risk of bladder cancer development in the Ukrainian population (OR = 5,6, 95 % CI = 3.19 to 9.34, $p < 0.0001$). **Keywords:** *TP53* gene, bladder cancer, polymorphism Arg72Pro, Ukrainian population.