

БИОМЕДИЦИНА ВА АМАЛИЁТ ЖУРНАЛИ ЖУРНАЛ БИОМЕДИЦИНЫ И ПРАКТИКИ JOURNAL OF BIOMEDICINE AND PRACTICE

Дилфуза Тошпулатовна АШУРОВА
Нигора Назимовна АБДУРАХМАНОВА
Норбиби Жаббаровна ЯДГАРОВА
Эъзо Бахадировна ШУКУРОВА
Гулал Комоловна ЮСУПОВА

Кафедра: Пропедевтика детских болезней, гематология.
Ташкентского Педиатрического Медицинского Института

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА rs1045642 ГЕНА MDR1 С РАЗВИТИЕМ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

For citation: D.T. Ashurova, N.N.Abdurakhmanova, N.D. Yadgarova, E.B. Shukurova, G.K. Yusupova ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF THE rs1045642 POLYMORPHISM OF THE MDR1 GENE WITH THE DEVELOPMENT OF MYELOPROLIFERTIVE DISEASES Journal of Biomedicine and Practice. 2021, vol. 6, issue 3, pp. 339-344

 <http://dx.doi.org/10.26739/2181-9300-2021-3-51>

АННОТАЦИЯ

Ранняя диагностика Миелопролиферативные заболевания (МПЗ) является одной из серьезных проблем онкогематологической практики. МПЗ относится к мультифакторным заболеваниям, на развитие которых влияют как факторы внешней среды, так и генетическая предрасположенность. В исследовании изучалась ассоциация носительства генотипа по полиморфному маркеру кодирующего гликопротеин-Р и развития МПЗ. Гомозиготный генотип Т/Т полиморфизма rs1045642 гена-MDR1 является значимым детерминантом повышенного риска развития МПЗ в Узбекистане ($P < 0.05$). Показана ассоциация генотипа Полиморфизм rs1045642 гена-MDR1 ассоциирован с риском развития МПЗ.

Ключевые слова: Миелопролиферативные заболевания, биотрансформация ксенобиотиков, генетические маркеры, полиморфизм гена.

Дилфуза Тошпулатовна АШУРОВА
Нигора Назимовна АБДУРАХМАНОВА
Норбиби Жаббаровна ЯДГАРОВА
Эъзо Бахадировна ШУКУРОВА
Гулал Комоловна ЮСУПОВА

Болалар касалликлари пропедевтикаси, гематология кафедраси
Ташкент Педиатрия Тиббиёт Институти

МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВ КАСАЛЛИКЛАРАНИ РИВОЖЛАНИШИДА ГЕН MDR1 ПОЛИМОРФИЗМИНИ rs1045642 АССОЦИАЦИАСИНИ ТЕКШИРИШ

АННОТАЦИЯ

Онкогематология амалиётида энг долзарб муомаларда бири Миелопролифератив касалликларда (МПК) эрта ташхис ҳисобланади. МПК ривожланишида генетик мойиллиги ва мултифакториал сабаблар ҳамда ташқи факторларга боғлиқ. Текширувлар rs1045642 полиморфизм MDR1 гени генотипини ассоциациясини ҳамда МПК ни ривожланишида хавфи иштирокини таҳлил қилинди. Гомозиготли генотип T/T полиморфизмининг rs1045642 гена–MDR1ни хавфли генотиплари 2,3 барабар МПКни ривожланиш эҳтилоли юқорилигини тахмин қилиш имконини берди Ўзбекистонда ($P<0.05$). Миелопролифератив беморларда ривожланиш хавфини полиморфизм rs1045642 гена–MDR1ни боғлиқлигини ўрганилди.

Калит сўзлар: Миелопролифератив касалик, биотрансформация ксенобиотиклар, генетик маркер, полиморфизм ген.

Dilfuza Tashpulatovna ASHUROVA
Nigora Nazimovna ABDURAKHMANOVA
Norbibi Djabbarovna YADGAROVA
Ezoza Bahodirovna SHUKUROVA
Gulasal Komilovna YUSUPOVA

Department of Propedeutics of Childhood Diseases,
Hematology. Tashkent Pediatric Medical Institute

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF THE rs1045642 POLYMORPHISM OF THE MDR1 GENE WITH THE DEVELOPMENT OF MYELOPROLIFERTIVE DISEASES

ANNOTATION

Early diagnosis of Myeloproliferative diseases (MPD) is one of the serious problems of oncohematological practice. MPD refers to multifactorial diseases, the development of which is influenced by both environmental factors and genetic predisposition. The study studied the association of the carriage of the genotype for the polymorphic marker encoding glycoprotein-P and the development of MPD. The homozygous T / T genotype of the rs1045642 polymorphism of the MDR1 gene is a significant determinant of the increased risk of developing MPD in Uzbekistan ($P<0.05$). Conclusion. Genotype association the rs1045642 polymorphism of the MDR1 gene is associated with the risk of developing MPD.

Key words: Myeloproliferative diseases, biotransformation of xenobiotics, genetic markers, gene polymorphism.

Миелопролиферативные заболевания (МПЗ) представляют собой клональные заболевания, возникающие на уровне гемопоэтических стволовых клетках [2].

Этиологические факторы и механизмы, вызывающие развитие МПЗ еще остаются не до конца изученными. Ведущей гипотезой является многоэтапность возникновения заболевания, где предрасположенность к болезни развивается под воздействием внешних канцерогенных факторов, повреждающих геном нормальной клетки и приводящих к ее злокачественной трансформации. [3]. К настоящему времени возможности базового обследования МПЗ не ограничиваются поиском диагностических генетических мутаций, таких как BCR/ABL, JAK2, MPL и др. В то же время, в последние годы, все больше внимания уделяется полиморфным вариантам генов системы биотрансформации ксенобиотиков. Установление взаимосвязи между выявлением определенного генотипа этих генов и определенной формой МПЗ может приблизить нас к пониманию механизмов формирования различных форм заболеваний. [4].

Ген MDR1 длиной 209660 п.н. локализован на коротком плече седьмой хромосомы (7q21.1). Он содержит 29 экзонов и экспрессируется с образованием транскрипта длиной 4916 н. [5.] Ген MDR1 кодирует синтез транспортного белка гликопротеина Р, который участвует в биотрансформации ксенобиотиков, защищая таким образом, клетки от воздействия различных токсических соединений. [6.] В настоящее время изучено несколько полиморфных вариантов

гена MDR1, но предпочтения, по исследованию ассоциаций с онкопатологиями, отдаются полиморфизму C3435T (rs1045642) [7.].

В мировой научной литературе имеются данные о вовлеченности гена MDR1 в развитие таких злокачественных заболеваний [8.10], различные варианты лейкоза [9], рак прямой кишки [10], рак эндометрия [11], ходжкинские лимфомы [13] и т. д.

Несмотря на это, пока не до конца ясна функциональная и клиническая значимость различных полиморфных вариантов данного гена при распределении токсических веществ и, как следствие, наличие подверженности к развитию злокачественных новообразований. Кроме того, до настоящего времени, пока нет единого мнения о роли полиморфного маркера rs1045642 гена MDR1 с манифестацией различных вариантов МПЗ.

Цель исследования. Оценка роли полиморфизма C3435T гена MDR1 в в патогенезе ХМЛ и эритромии.

Материалы и методы. Работа выполнена на образцах ДНК выделенных из периферической крови пациентов, наблюдавшихся на базе клиники НИИ гематологии и переливания крови МЗ РУз. Исследовано 138 больных, из них 109 ХМЛ, 29 больной с эритромией.

Контрольная группа была сформирована из 86 лиц узбекской национальности, без каких-либо онкологических заболеваний.

Выделение ДНК из цельной крови проводили с помощью стандартного набора производства Рибо-сорб (AmpliSens®, Россия). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на приборе NanoDrop 2000 (США). Генотипирование полиморфного варианта rs1045642 гена MDR1 проводилось методом стандартной ПЦР, с использованием структуры праймеров, которые были описаны на интернет-сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP> (табл. 1).

Тестирование проводилось на программируемом термоциклере фирмы «Applied Biosystems» (США), с использованием тест-систем компании «Литех» (Россия), согласно инструкции производителя (рис. 1).

Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

Таблица 1. Структура олигонуклеотидных праймеров

№	Ген локализация	Полиморфизм	Структура олигопраймеров
1	MDR1	rs1045642	F: 5'-AGAGAGACTTACATTAGGCAG-3' R: 5'-R 5AGTGGCTCCGAGCACACC-3'.

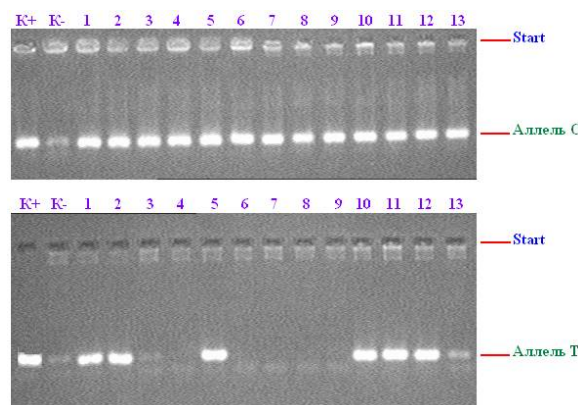


Рисунок 1. Электрофореграмма детекции полиморфизма rs1045642 гена –MDR1

Результаты и обсуждение.

По данным NCBI в гене MDR1 насчитывается более 50 полиморфизмов (SNPs). Среди них наибольший интерес проявлен к полиморфному маркеру C3435T. По данным авторов, частота встречаемости гетерозиготных генотипов данного полиморфизма в европейской популяции составила 48,3%, а гомозигот в той же группе – 23,9%. [1, 12].

В таблицах 2 и 3 продемонстрированы результаты сравнительных исследований генетической структуры полиморфизма rs1045642 гена – MDR1 в выборках больных с миелопролиферативным заболеванием (МПЗ) и контроля. Распределение частот встречаемости генотипов полиморфного локуса rs1045642 гена –MDR1 в группе больных и в контрольной группе соответствовало ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга ($P>0,05$). Обнаружен высокий уровень ожидаемой гетерозиготности (0,47%) в популяционной выборке. При диаллельном полиморфизме данный показатель является показателем значительного разнообразия популяции, равен к максимальному (0.5%). Это означает, что около 50% индивидуумов в нашей популяции несут аллель Т в гетеро или в гомозиготном состоянии.

Таблица 2. Ожидаемая и наблюдаемая частота распределения генотипов по PXB полиморфизма rs1045642 гена –MDR1 в основной группе больных

Генотипы	частота генотипов		χ^2	Р
	наблюдаемая	ожидаемая		
С/С	26,81	25,00	0,181	0,3946
С/Т	46,38	50,00	0,362	
Т/Т	26,81	25,00	0,181	
Всего	100,00	100,00	0,725	

Таблица 3. Ожидаемая и наблюдаемая частота распределения генотипов по PXB полиморфизма rs1045642 гена –MDR1 в популяционной группе

Генотипы	частота генотипов		χ^2	Р
	наблюдаемая	ожидаемая		
С/С	39,53	39,43	0,000	0,9658
С/Т	46,51	46,73	0,001	
Т/Т	13,95	13,85	0,001	
всего	100,00	100,00	0,002	

Если говорить об эффективности данного локуса в качестве самостоятельного маркера, то необходимо отметить относительно высокий уровень его специфичности с показателем $SP=0,73$ с $SE=0,39$ (ДИ 95% 1.006-3.166). Рассчитанный показатель AUC (0.73) демонстрирует высокий уровень эффективности по классификатору данного полиморфизма в качестве самостоятельного гена-кандидата, при достоверно высоких значениях ($OR=1.8$; $P<0.05$).

Сопоставление частот встречаемости аллелей и генотипов rs1045642 гена –MDR1 среди больных с МПЗ и группы сравнения проведено методом «случай-контроль».

Таблица 4. Частота распределения аллелей и генотипов полиморфизма rs1045642 гена – MDR1 в исследуемой группе пациентов и в популяционной выборке

№	Группа	N	Частота аллелей				Частота распределения генотипов					
			С		Т		С/С		С/Т		Т/Т	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	Основная группа	138	138	50,0	138	50,0	37	26,8	64	46,4	37	26,8
1.1	ХМЛ	109	106	48,6	112	51,4	28	25,7	50	45,9	31	28,4

1.2	Эритремия	29	32	55,2	26	44,8	9	28,1	14	43,7	6	18,7
2	Контрольная группа	86	108	62,8	64	37,2	34	39,5	40	46,5	12	13,9

Проведенный анализ выявил достоверные различия в распределении частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs1045642 гена –MDR1 у больных МПЗ и в группе контроля (табл. 4).

В объединенной выборке больных достоверно чаще встречалась аллель Т по сравнению с группой контроля (50.0% и 51.4%, соответственно; $\chi^2=6,5$; $P=0,01$; $OR=1,9$; 95% CI 1,144, 2,49). Частота данного аллеля в 1.8 раз значительно выше в подгруппе больных ХМЛ, чем у здоровых доноров ($\chi^2=7,8$; $P=0,005$; $OR=1,8$; 95%CI 1,186, 2,68). В то же время различие по частоте данного аллеля между подгруппой больных эритремией и контроля оказались несущественными (44,8% и 37,2%, соответственно; $p>0,05$).

В объединенной выборке и в подгруппах больных ХМЛ частота неблагоприятного генотипа Т/Т также достоверно преобладала над ее уровнем в группе контроля (26,8% и 28,4% против 13,9% соответственно). Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов наличие данного генотипа в 2,3 раза увеличивало риск развития МПЗ ($\chi^2=5,1$; $P=0,02$; $OR=2,3$; 95%CI 1,103, 4,626). Отмечено некоторое повышение частоты встречаемости данного генотипа и в подгруппе больных эритремией по сравнению с группой контроля, что свидетельствует о наличии тенденции к ассоциации неблагоприятного генотипа с формированием МПЗ (18.7% против 13.9%, соответственно; $p>0,05$).

Частота гомозиготного генотипа по аллели С, напротив была достоверно ниже в группе больных (26,8%), чем в контроле (39,5%), что свидетельствует о благоприятном протективном эффекте данного генотипа в отношении развития болезни ($\chi^2=3,9$; $P=0,046$; $OR=0,6$; 95%CI 0,3158, 0,994).

Отмечена тенденция к снижению частоты данного генотипа в подгруппе больных эритремией по сравнению с контрольной группой (28.1% против 39.5%, соответственно). При этом, различия не достигли уровня пороговой значимости ($\chi^2=0,6$; $P=0,4$; $OR=1,4$; 95%CI 0,5922, 3,565).

Также стоит отметить, что при сравнении подгрупп больных и контроля нами также было выявлено достоверное повышение частоты генотипа С/С в популяционной выборке по сравнению с подгруппой больных ХМЛ (39,5% против 25,7%, соответственно; $\chi^2=4,2$; $P=0,04$; $OR=0,5$; 95% CI 0.2874, 0,9725).

Вместе с тем, частота гетерозиготного генотипа С/Т rs1045642 гена–MDR1 во всех исследованных группах (больных и контроля) была сходной, и не достигла статистически значимых отличий от группы контроля ($P>0,05$).

Таким образом, анализируя полученные результаты, можно сделать заключение, о том, что гомозиготный генотип Т/Т полиморфизма rs1045642 гена–MDR1 является значимым детерминантом повышенного риска развития МПЗ в Узбекистане ($P<0.05$). Эти данные еще больше укрепляют позицию полиморфизма rs1045642 гена–MDR1 как маркера, обуславливающего нарушение регуляторной функции гликопротеина Р и процессов биотрансформации ксенобиотиков и, возможно, ассоциированного с формированием онкологических процессов.

Выводы:

1. Полиморфизм rs1045642 гена–MDR1 ассоциирован с риском развития МПЗ. Функционально неблагоприятный генотип Т/Т является предрасполагающим маркером к нарушению уровня экспрессии гликопротеина Р и элиминации различных токсинов и канцерогенов из организма. Напротив, носительство дикого генотипа С/С достоверно ассоциировано с протективным эффектом в отношении развития МПЗ ($P<0.05$).
2. Прогностическая ценность генотипирования полиморфизма rs1045642 гена–MDR1 демонстрирует высокий уровень эффективности по классификатору в качестве самостоятельного гена-детерминанта формирования МПЗ, при достоверно более высоких значениях ($P<0.05$).

Список литературы:

1. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатъев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика: Учебное пособие/ Под ред. В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007.-с. 9
2. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*.2000;96:3343–3356.
3. Rumjanek V.M, Vidal R.S, Maia R.C. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia *Biosci Rep*.2013;33
4. Mabel Lardo,¹ Marcelo Castro,² Beatriz Moiraghi,³ Francisca Rojas,⁴ MDR1/ABCB1 gene polymorphisms in patients with chronic myeloid leukemia 2015 sep;50(3):154-159
5. Callen D.F., Baker E., Simmers R.N., Seshadri R., Roninson I.B. 1987. Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7 q21.1. *Hum. Genet.* 77, 142–144.
6. Chin J.E. , Soffir R. , Noonan K.E. , Kyunghie C. , Roninson I.B. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. // *Molecular and Cellular Biology*. 1989. 9, 3808-3820. *Molecular and Cellular Biology*. 1989
7. Chen C., Clark D., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B. 1990. Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 265, 506–514.
8. Rao DN, Anuradha C, Vishnupriya S, Sailaja K, Surekha D, Raghunadharao D, Rajappa S. Association of an MDR1 gene (C3435T) polymorphism with acute leukemia in India. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(4):1063-6.
9. Qian X, Cao S, Yang G, Dong J, Jin G, Shen Y, Hu Z. Variant genotypes of MDR1 C3435T increase the risk of leukemia: evidence from 10 case-control studies. *Leuk Lymphoma*. 2012 Jun;53(6):1183-7.
10. Andersen V, Ostergaard M, Christensen J, Overvad K, Tjonneland A, Vogel U. Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer a Danish prospective case-cohort study. *BMC Cancer*. 2009 Nov 21; 9:407.
11. Mrozikiewicz PM, Seremak-Mrozikiewicz A, Semczuk A, Landt O, Breborowicz GH, Drews K. The significance of C3435T point mutation of the MDR1 gene in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 May-Jun;17(3):728-31.
12. Nizar M Mhaidat, Osama Y Alshogran, Omar F Khabour, Kareem H Alzoubi, Ismail I Matala, William J Haddadin, Ibraheem O Mahasneh, and Ahmad N Aldaheer. Multi-drug resistance 1 genetic polymorphism and prediction of chemotherapy response in Hodgkin's Lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30(1): 68.
13. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmöller J., John A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., Brinkmann U. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 3473–3478.