

ГЕНЕТИКА

УДК: 575.113.2:616.155.392-006.44

doi: 10.25128/2078-2357.19.2.9

О. О. ДМИТРЕНКО, І. В. ДМИТРЕНКО, Ж. М. МІНЧЕНКО, І. С. ДЯГІЛЬ

Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»
вул. Мельникова, 53, Київ, 04050
e-mail: iryna.v.dmytrenko@gmail.com

АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ СИСТЕМИ HLA У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ МІЄЛОЇДНУ ЛЕЙКЕМІЮ З e13a2 та e14a2 ТРАНСКРИПТАМИ ГЕНА *BCR/ABL1*

Для дослідження асоціативного взаємозв'язку поліморфних варіантів генів системи HLA з типами транскриптів химерного гена *BCR/ABL1* у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) обстежено 87 пацієнтів з ХМЛ, які відрізнялися транскриптами гена *BCR/ABL1*: 42 пацієнти з транскриптом e13a2 та 45 пацієнтів з транскриптом e14a2. Проаналізовано поширеність алельних варіантів генів головного комплексу гістосумісності людини і обчислено коефіцієнти асоціативного зв'язку з ризиком виникнення захворювання залежно від носійства певних типів транскриптів химерного гена *BCR/ABL1*.

Виділені безумовні маркери підвищеного ризику розвитку ХМЛ (*HLA-DRB1*11*) і маркери резистентності до розвитку ХМЛ (*HLA-A*03*). У пацієнтів з транскриптом e13a2 частоти алелей *HLA-A*03*, *HLA-A*68*, *HLA-B*08*, *HLA-B*15*, *HLA-B*40*, *HLA-DRB1*04* та *DQB1*06* були вірогідно зниженими, а *HLA-DRB1*12* та *DRB1*11* були підвищені у порівнянні зі здоровими особами. Частоти алелей *HLA-A*03*, *HLA-A*11*, *HLA-B*08*, *HLA-B*14*, *HLA-B*40*, *HLA-DRB1*04* та *DQB1*03* були вірогідно знижені, а частота алеля *HLA-DRB1*11* була вірогідно підвищена у пацієнтів з транскриптом e14a2 порівняно зі здоровими особами. Таким чином індивідуальний аналіз хворих на ХМЛ за наявності комплексу химерних протеїнів e13a2 та e14a2 та алелей HLA свідчить про адитивний ефект сумісності носійства цих молекулярних структур щодо ризику розвитку ХМЛ.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, транскрипти гена *BCR/ABL*, алельний поліморфізм, системи HLA.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – це мієлопроліферативне захворювання, яке характеризується підвищеною проліферацією елементів гранулоцитарної ланки гемопоезу. Серед усіх лейкемій її частка становить 20% [1]. Розвиток ХМЛ пов'язують з появою в стовбуровій клітині транслокації t(9;22)(q34;q11.2), що призводить до утворення химерного гена *BCR/ABL1* [2]. Залежно від місця локалізації розриву, у гені *BCR* можливе утворення декількох варіантів транскриптів гена *BCR/ABL1*, серед яких найбільш поширеними є транскрипти e13a2 (b2a2) та e14a2 (b3a2) [3]. У результаті підвищеної тирозинкіназної активності білка *BCR/ABL1* збільшується проліферативна активність клітин та пригнічується апоптоз, зменшується залежність клітин від цитокінів та знижується клітинна адгезія [4].

У сучасних дослідженнях виявлено, що в багатьох процесах ініціації й розвитку злоякісних захворювань безпосередню участь беруть молекули глікопротеїнів клітинної поверхні, які кодуються генами найбільш поліморфної системи людини HLA (Human Leucocyte

Antigens) [5]. З огляду на різноманіття функцій HLA-системи (участь у розпізнаванні чужорідного антигену, його презентації, міжклітинній взаємодії), зрозуміло, що порушення будь-якого з цих механізмів здатне істотно послабити імунологічний нагляд й ініціювати розвиток хвороби [6, 7]. Реєстрація негативного зв'язку захворювання з певним геном HLA вказує на підвищену здатність молекули HLA до зв'язування антигена і зниження ризику розвитку хвороби у конкретного індивіда. Натомість, позитивна асоціація гена HLA із захворюванням веде до непродуктивного зв'язування цими молекулами HLA антигенного пептида, імунної ареактивності і підвищеного ризику розвитку захворювання [8, 9].

Отже, формування клінічного статусу індивіду визначається декількома механізмами, що взаємодіють, серед яких є поява соматичної мутації (химерного гена *BCR/ABL1*) та поліморфізм HLA-системи, що свідчить про високий ступінь залученості в механізмах формування патологічного процесу імунологічної компоненти на рівні даних генетичних систем та обумовлює актуальність вивчення взаємодії молекулярно-генетичних і імуногенетичних детермінант.

Метою роботи було дослідження асоціативного взаємозв'язку поліморфних варіантів генів системи HLA з типами транскриптів химерного гена *BCR/ABL1* у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію.

Матеріал і методи досліджень

Проведено обстеження 87 пацієнтів із хронічною мієлоїдною лейкемією (46 жінок та 41 чоловік) віком від 18 до 65 років на момент встановлення діагнозу (у середньому $41,17 \pm 12,89$ років). Пацієнтів було відібрано із групи хворих на ХМЛ, які перебували під наглядом або на консультативному прийомі у відділенні радіаційної онкогематології і трансплантації стовбурових клітин Інституту клінічної радіології Національного наукового центру радіаційної медицини в період з 2001 по 2017 рр. Усі пацієнти надали інформовану згоду на використання їх біоматеріалу для дослідження. За контрольну групу була обрана популяція 150 осіб (генетична структура за генним представництвом алелей HLA-системи), які мешкають в Центральному гено-географічному регіоні України.

Молекулярно-генетичне дослідження типу транскрипта гена *BCR/ABL1* проводили методом якісної зворотнютранскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Загальну РНК одержували з клітин периферичної крові шляхом фенол-хлороформної екстракції, преципітації ізопропанолом та відмивки в етанолі за загальною методикою Хомчинського [10]. Для зворотної транскрипції використовували гексамерні праймери і M-MuLV ревертазу (Fermentas, Латвія). Режимми інкубації відповідали рекомендаціям фірми-виробника. Гніздову ЗТ-ПЛР проводили з праймерами до гена *BCR/ABL1 p210* у відповідності з протоколом, рекомендованим Європейською програмою BIOMED-1 «Дослідження мінімальної резидуальної хвороби при гострих лейкеміях: міжнародна стандартизація і клінічна оцінка». ПЛР-продукт візуалізували у 2% агарозному гелі [11].

Імуногенетичний статус оцінювали за системою HLA. Виділення ДНК проводили з клітин периферичної крові реагентами Protrans DNA Box 500 (Німеччина) відповідно до інструкцій виробника. Ідентифікацію алельного поліморфізму генів головного комплексу гістосумісності (*HLA-A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1*) з роздільною здатністю на рівні груп HLA-алелей проводили методом полімеразної ланцюгової реакції з сиквенс-специфічними праймерами (Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction, PCR-SSP) із використанням наборів Protrans.

Статистичний аналіз результатів дослідження імуногенетичного статусу проводили методами математичної статистики, які використовуються в клінічній імуногенетиці. Для вивчених параметрів розраховували відносні коефіцієнти асоціативних зв'язків (relative risk (RR)) і ступінь їх достовірності з використанням комп'ютерної програми імуногенетичного моніторингу з метою формування груп ризику з реалізації генетичної схильності до онкогематологічних захворювань.

Результати досліджень та їх обговорення

Грунтуючись на припущенні, що HLA-молекули, здатні до взаємодії з гібридними e1a2 або/та e14a2 пептидами, повинні асоціюватися зі схильністю та/або резистентністю до розвитку ХМЛ, було досліджено поширеність HLA-алелей в двох групах хворих на ХМЛ, які відрізнялись транскриптами гена *BCR/ABL1*: 42 пацієнти з транскриптом e13a2 та 45 пацієнтів з транскриптом e14a2 (табл. 1, табл. 2).

Таблиця 1

Поширеність HLA-алелей у хворих на ХМЛ-носіїв транскрипта e13a2 гена *BCR/ABL1* та контрольною групою здорових осіб

HLA-алелі	Група хворих (n=42)	Контрольна група (n=150)	Коефіцієнт відносного ризику (RR)	Вірогідність розбіжностей (p)
<i>A*03</i>	0,023	0,190	0,26	<0,005
<i>A*68</i>	0,015	0,030	0,34	<0,025
<i>B*08</i>	0,023	0,110	0,42	<0,05
<i>B*15</i>	0,015	0,050	0,28	<0,005
<i>B*40</i>	0,023	0,110	0,42	<0,05
<i>DRB1*04</i>	0,025	0,120	0,36	<0,05
<i>DRB1*11</i>	0,210	0,090	4,57	<0,05
<i>DRB1*12</i>	0,192	0,080	4,94	<0,05
<i>DQB1*06</i>	0,023	0,190	0,26	<0,005

Таблиця 2

Поширеність HLA-алелей у хворих на ХМЛ-носіїв транскрипта e14a2 гена *BCR/ABL1* та контрольною групою здорових осіб

HLA-алелі	Група хворих (n=45)	Контрольна група (n=150)	Коефіцієнт відносного ризику (RR)	Вірогідність розбіжностей (p)
<i>A*03</i>	0,031	0,190	0,25	<0,005
<i>A*11</i>	0,015	0,050	0,48	<0,05
<i>B*08</i>	0,021	0,110	0,37	<0,05
<i>B*14</i>	0,015	0,070	0,31	<0,05
<i>B*40</i>	0,021	0,110	0,37	<0,05
<i>DRB1*04</i>	0,025	0,120	0,37	<0,05
<i>DRB1*11</i>	0,232	0,090	5,24	<0,025
<i>DQB1*03</i>	0,062	0,280	0,34	<0,025

Порівняльний аналіз HLA-генотипової характеристики хворих на ХМЛ – носіїв гібридних транскриптів e13a2 або e14a2 – та контрольної групи здорових осіб свідчить про характерні особливості поширеності ізольованих алелей генів *A*, *B*, *DRB1*, *DQB1* у досліджуваних групах. У носіїв транскрипта e13a2 для гена *HLA-A* була вірогідно знижена концентрація алельних груп *HLA-A*03* та *-A*68* (RR=0,26, p<0,005 та RR=0,34, p<0,025, відповідно) порівняно з контрольною групою. Така сама тенденція простежується і в групі носіїв транскрипта *b3a2*. Однак, разом з алельною групою *HLA-A*03* протективну функцію виконує алельна група *HLA-A*11* (RR=0,25, p<0,005 та RR=0,48, p<0,05, відповідно).

Аналіз розподілу специфічних складників гена *HLA-B* у групах хворих на ХМЛ з різними транскриптами порівняно з контрольною групою виявив вірогідне зниження представництва алельних груп *HLA-B*08* (RR=0,42, p<0,05 та RR=0,37, p<0,05 відповідно) та *HLA-B*40* (RR=0,42, p<0,05 та RR=0,37, p<0,05 відповідно). На відміну від групи носіїв e13a2-транскрипта, яка характеризувалася високим коефіцієнтом асоціації з резистентністю до розвитку ХМЛ для алельної групи *HLA-B*15* (RR=0,28, p<0,005), хворі носії *b3a2*-транскрипта мали знижену концентрацію *HLA-B*14* (RR=0,31, p<0,05).

У гені *HLA-DRB1* серед носіїв патологічних транскриптів вірогідні відмінності в частоті збігу порівняно з контролем відзначеним для алельних груп *HLA-DRB1*11* (RR=4,57, $p<0,05$), *HLA-DRB1*12* (RR=4,94, $p<0,05$) у хворих носіїв $e13a2$ -транскрипта, а також алель-індуктор розвитку ХМЛ – *HLA-DRB1*11* (RR=5,24, $p<0,025$) у групі хворих носіїв $e14a2$ -транскрипту. Алельна група *HLA-DRB1*04* (RR=0,36, $p<0,05$ та RR=0,37, $p<0,05$ відповідно) зустрічається вірогідно рідше в обох групах порівняно із контролем. Для генів *HLA-C*, *HLA-DQA1* та *HLA-DQB1* не встановлені асоціативні зв'язки з виникненням ХМЛ у носіїв різних типів патологічних транскриптів. У представництві алельних груп гена *HLA-DQB1* вірогідно знижена концентрація *HLA-DQB1*03* (0,097 проти 0,280 у контролі) та *HLA-DQB1*06* (0,023 проти 0,119 у контролі) у носіїв транскрипту $e13a2$. Вірогідно рідше зустрічалася алельна група *HLA-DQB1*03* (0,062 проти 0,280 у контролі) у хворих опозитної групи порівняння.

Висновки

Отже, на основі аналізу поширеності алелей системи HLA у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію і обчисленні коефіцієнта асоціативного зв'язку з ризиком виникнення захворювання, виділені безумовні маркери підвищеного ризику розвитку ХМЛ: *HLA-DRB1*11* і маркери резистентності до розвитку ХМЛ-алелі *HLA-A*03*.

У пацієнтів з транскриптом $e13a2$ частоти алелей *HLA-A*03*, *HLA-A*68*, *HLA-B*08*, *HLA-B*15*, *HLA-B*40*, *HLA-DRB1*04* та *DQB1*06* були вірогідно зниженими, а *HLA-DRB1*12* та *DRB1*11* – підвищені у порівнянні зі здоровими особами.

Частоти алелей *HLA-A*03*, *HLA-A*11*, *HLA-B*08*, *HLA-B*14*, *HLA-B*40*, *HLA-DRB1*04* та *DQB1*03* були вірогідно знижені, а частота алеля *HLA-DRB1*11* була вірогідно підвищена у пацієнтів з транскриптом $e14a2$ порівняно із здоровими особами.

Індивідуальний аналіз хворих за наявністю комплексу химерних протеїнів $e13a2$ та $e14a2$ та алелей HLA свідчить про адитивний ефект наявності цих молекулярних структур щодо ризику розвитку ХМЛ. Підвищена наявність носійства *HLA-DRB1*11* та знижене носійство *HLA-A*03*, було характерним для обох транскриптів, що свідчить про спільне спрямування механізмів реалізації генетичної схильності до захворювання, або формування протективної функції на основі генерації пухлин-специфічної цитотоксичної Т-клітинної відповіді, як передумови елімінації патологічного білка при взаємодії HLA-молекул з $e13a2$ або/та $e14a2$ пептидами. Цей факт свідчить про можливість наявності взаємопов'язаних механізмів формування захворювання на рівні цих генетичних систем і окреслює можливості розширення спектру генетичних чинників прогнозу виникнення і перебігу захворювання, що в кінцевому результаті сприятиме оптимізації терапії хронічних мієлопроліферативних захворювань.

1. *Jabbour E.* Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring / E. Jabbour, H. Kantarjian // *Am. J. Hematol.* – 2016. – Vol. 91. – P. 252–265.
2. *Dmytrenko I. V.* Assessment of response to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia with $e13a2$ and $e14a2$ transcripts of BCR/ABL1 gene / I. V. Dmytrenko, V. G. Fedorenko, T. Y. Shlyakhtychenko et al // *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* – 2015. – Sep. 20. – P. 328–340.
3. *Hanfstein B.* Distinct characteristics of $e13a2$ versus $e14a2$ BCR'ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib / B. Hanfstein, M. Lauseker, R. Hehlmann et al. // *Haematologica.* – 2014. – Vol. 99, №. 9. – P. 1441–1447.
4. *Lucas C. M.* Chronic myeloid leukemia patients with the $e13a2$ BCR'ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the $e14a2$ transcript / C. M. Lucas, R. J. Harris, A. Giannoudis et al. // *Haematologica.* – 2009. – Vol. 94, №. 10. – P. 1362–1367.
5. *Bateman A.* Human leukocyte antigens and cancer: is it in our genes? / A. Bateman, W. Howell // *J. Pathology.* – 2007. – Vol. 196, № 3. – P. 231–236.
6. *Minchenko J. M.* Role of radiosensitivity and radioresistance genetic markers in hematological and cardiovascular disease in persons exposed after the Chernobyl accident / J. M. Minchenko, I. S. Dyagil, O. O. Dmytrenko et al // *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* – 2013. – Sep. 18. – P. 220–231.
7. *Matzaraki V.* The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases / V. Matzaraki, V. Kumar, C. Wijmenga, A. Zernakova // *Genome Biol.* – 2017. – Vol. 18, №. 1. – P. 76. Published online 2017 Apr 27. doi: 10.1186/s13059-017-1207-1.

8. *Ureshino H.* Allelic polymorphisms of KIRs and HLAs predict favorable responses to tyrosine kinase inhibitors in CML / H. Ureshino, T. Shindo, H. Kojima et al. // *Cancer Immunol. Res.* – 2018. Published online 2018 Apr 25. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0462.
9. *Mundhad S.* Association of HLA Class I and Class II genes with *bcr-abl* transcripts in leukemia patients with t(9;22) (q34;q11) / S. Mundhada, R. Luthra, P. Cano // *Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 4–25.
10. *Chomczynski P.* Single step method of RNA isolation by acid and guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.*— 1987. — Vol. 162, № 1. — P. 156–159.
11. *Van Dongen J. M.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease / J. M. van Dongen, E. A. Macintyre, J. A. Gabert et al. // *Leukemia.* – 1999. – Vol. 13. – P. 1901–1928.

O. O. Dmytrenko, I. V. Dmytrenko, Zh. M. Minchenko, I. S. Diahil

State Institution «National Scientific Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

ALLELIC POLYMORPHISM OF THE HLA SYSTEM IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA WITH E13A2 AND E14A2 TRANSCRIPTS OF THE BCR / ABL1 GENE

To study the associative relation of polymorphic HLA gene variants and BCR/ABL1 transcript types in patients with chronic myeloid leukemia (CML) 87 CML patients were examined. 42 patients had e13a2 BCR/ABL1 transcript and 45 patients had e14a2 BCR/ABL1 transcript. The prevalence of the genes allelic variants of major histocompatibility complex was analyzed and the association coefficients for the disease risk depending on the presence of certain types of BCR/ABL1 transcripts were calculated.

Unconditional markers of increased risk of CML (HLA-DRB1*11) and markers of resistance to CML (HLA-A*03) were highlighted. The allele frequencies of HLA-A*03, HLA-A*68, HLA-B*08, HLA-B*15, HLA-B*40, HLA-DRB1*04, DQB1*06 were significantly reduced and allele frequencies of HLA-DRB1*12 and DRB1*11 were increased in patients with the e13a2 transcript compared to healthy people. The allele frequencies of HLA-A*03, HLA-A*11, HLA-B*08, HLA-B*14, HLA-B*40, HLA-DRB1*04 and DQB1* 03 were significantly reduced and the allele frequency of HLA-DRB1*11 was significantly increased in patients with e14a2 transcript compared to healthy persons. Thus, the individual analysis of the complex of fusion proteins e13a2 and e14a2 and HLA alleles in CML patients could indicate the additive effect of both molecular structures joint carrier for CML developing risk.

Key words: chronic myeloid leukemia, BCR/ABL1 transcripts, allelic polymorphism, HLA systems.

Надійшла 23.04.2019.