



УДК 616.12-008.341.2-06:616-057.52]-077

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ ATM У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Руденкова Т.В.¹, Костюк С.А.¹, Климкович Н.Н.¹, Козич Ж.М.²

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

²ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»,
г. Гомель, Республика Беларусь

Реферат. У пациентов с множественной миеломой в ходе исследования установлен более высокий уровень распространенности полиморфизмов rs189037; rs228590; rs1801516 в гене *ATM*, в сравнении со здоровыми лицами контрольной группы ($p < 0,05$). Среди пациентов контрольной группы не выявлено носителей гомозиготных мутантных генотипов, а распространность мутантных аллелей в составе гетерозиготных генотипов составила 1,67–3,33 %. Для пациентов с множественной миеломой носительство мутантных аллелей выявлено в составе как гетерозиготных, так и гомозиготных мутантных генотипов. Распространенность мутантных аллелей в составе полиморфизмов rs189037; rs228590; rs1801516 в гене *ATM* у пациентов с множественной миеломой составила от 15,00 % до 36,00 %.

Ключевые слова: множественная миелома; полиморфизм; ген; *ATM*.

Введение. Белок ATM (ataxia telangiectasia mutated) – протеинкиназа, первоначально выделенная и охарактеризованная у пациентов с атаксией-телеангидракзией (AT), редким заболеванием человека, наследуемым по аutosомно-рецессивному типу, которое описано как специфическая болезнь в 1957 г. Состояние при AT характеризуется нейродегенерацией, мозжечковой атаксией, окуломоторной апраксией, хореоатетозом, телеангидракзиями конъюнктивы, частыми инфекциями, иммунодефицитом, радиочувствительностью. В дополнение к основным характерным симптомам и клиническим проявлениям у пациентов с AT повышен риск развития злокачественных новообразований [1].

Белок ATM является членом семейства се-рин/треониновых протеинкиназ ((PI)3/PI4-киназ), который играет ключевую роль при ответе на повреждение ДНК, в том числе при двойных разрывах спирали. Двухцепочечные разрывы ДНК являются одной из самых серьезных угроз целостности эукариотического генома, поэтому для поддержания его целостности, предотвращения накопления и передачи ошибок при делении в клетках существуют системы белков, они активируются при повреждении генетического материала, их функционирование направлено на поддержание и восстановление генетической информации [1; 2; 3].

Поддержание геномной целостности и стабильности генома необходимо для всех типов клеток и является фактором их защиты от зло-

качественной трансформации. ATM выступает в качестве ключевого фактора для этих процессов, так как участвует в распознавании и восстановлении двухцепочечных разрывов ДНК [3].

Повреждение ДНК приводит к каноническому пути активации ATM, при котором MRN-комплекс, состоящий из белков Mre11, RAD50 и NBS1 активирует ATM. Обычно ATM присутствует в клетках в форме неактивного димера или мультимерных комплексов. После повреждения ДНК ATM подвергается аутофосфорилированию в S1981, что приводит к разделению неактивного димерного комплекса с образованием высокоактивных мономеров. Далее MRN-комплекс способствует взаимодействию мономеров ATM с концевыми участками поврежденной ДНК и с субстратами. Активная форма ATM запускает фосфорилирование нижестоящих белков-мишеней, в том числе белка reparacji ДНК NBS1 [1; 3].

Ген *ATM* расположен на 11 хромосоме (11q22-23), его длина составляет более 150 000 п.о., протяженность кодирующей последовательности 9 168 п.о. Ген содержит 66 экзонов, расположенных по всей геномной области, 62 из которых кодируют аминокислотную последовательность белка массой 350 кДа, состоящего из 3056 аминокислот. Кроме экзонов ген содержит прилегающие инtronные и нетранслируемые последовательности, которые вырезаются в ходе сплайсинга при созревании мРНК. Значимые изменения, которые оказы-

вают влияние на структуру и функции белка ATM, могут происходить как в транслируемой области, так и в инtronных и нетранслируемых участках гена [2].

Совершенствование и широкое внедрение молекулярно-генетических методов, особенно технологий секвенирования нового поколения (NGS) позволили выявить более 10 000 однонуклеотидных замен в гене *ATM*, из которых более 1900 отнесены к патогенным [1, 2].

Полиморфизм rs189037 (с.-111G>A) расположен в промоторной области гена *ATM* и является одним из критических полиморфизмов, которые ассоциированы с возникновением различных видов злокачественных новообразований и способностью опухоли к распространению. В ряде исследований было показано, что изменения в последовательности промотора могут потенциально изменять сродство множественных взаимодействий регуляторных белков с ДНК или влиять на специфичность процесса транскрипции. Хотя этот полиморфизм не приводит к изменению аминокислотной последовательности, однако различные аллели могут изменять сродство к факторам транскрипции, что приводит к различным уровням экспрессии мРНК [4; 5; 6].

В ряде исследований показано, что генотип AA в составе полиморфизма rs189037 в гене ATM связан с более низкими уровнями мРНК, чем генотип GG, т.к. замена G на A создает сайт связывания для ингибитора транскрипции в области промотора гена *ATM*, что приводит к снижению уровня экспрессии гена. Это вызывает дефекты активации контрольных точек клеточного цикла, сниженную способность к репарации ДНК и аномальный апоптоз в клетках, повышая риск возникновения злокачественных новообразований: карцинома щитовидной железы, рак полости рта, рак молочной железы, лейкемия, карцинома носоглотки, глиома, рак легкого [6; 7].

Полиморфизм rs1801516 (с. 5557G > A) в 39 экзоне гена *ATM* приводит к изменению аминокислоты в позиции 1853 (Asp1853Asn, D1853N) белка ATM. Этот полиморфизм описан как влияющий на экзонный энхансер сплайсинга, что предполагает возможное изменение нормального сплайсинга 39 экзона гена *ATM* и, следовательно, выработку белка с измененной структурой и функциями. В ряде опубликованных исследований уста-

новлено, что частота данного полиморфизма повышена у пациентов с некоторыми злокачественными новообразованиями [3; 4].

Полиморфизм rs228590 с.49238C > T, локализуется в интроне 1 гена *ATM*, и, по современным представлениям, влияет на связывание некоторых факторов транскрипции затрудняя синтез мРНК, уменьшая уровень экспрессии гена и, в конечном итоге, снижая активность белка ATM [7].

Серьезные клинические проявления, следствие вариаций нуклеотидной последовательности в гене *ATM*, послужили причиной проведения многочисленных исследований, направленных на изучение его изменений при различных патологических процессах во многих странах, т.к. результаты зачастую отличаются при проведении исследований в различных расовых, этнических и популяционных группах [1; 2; 3].

Цель исследования – изучить распространенность полиморфизмов rs189037 (с. -111G > A); rs228590 (с.49238C>T); rs1801516 (с. 5557G > A) в гене *ATM* у пациентов с множественной миеломой.

Материалы и методы. В основную группу исследования были включены 50 пациентов с диагнозом ММ, проходивших обследование в ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» г. Гомель с 2018 по 2024 гг. (среднее время наблюдения составило 60 месяцев). Диагноз пациентам установлен в соответствии с критериями IMWG (International Myeloma Working Group). В контрольную группу были включены 30 практически здоровых доноров без острых и системных хронических заболеваний.

Распределение по гендерному признаку в каждой группе было равномерным: ММ – 26 женщин (52,00 %) и 24 мужчины (48,00 %); контрольная группа – 16 мужчин (53,33 %) и 14 женщин (46,67 %). Медиана возраста пациентов составила: ММ – 64 года (53,0...76,0); контрольная группа – 46,0 год (43,0...65,0).

В качестве биологического материала у пациентов с ММ проводили взятие костного мозга методом аспирационной биопсии (объем 2 мл). В качестве биологического материала у пациентов контрольной группы проводили взятие периферической крови, в объеме не менее 2 мл. Кровь забирали в стерильные вакуумные пробирки («МиниМед», РФ). Выделение ДНК из биологического материала



проводили с использованием коммерческого набора реагентов «АртСпин Эксперт» («АртБиоТех», Беларусь).

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования («NanoDrop 1000», «Thermo Fisher Scientific»), определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

ДНК, выделенную из биологического материала пациентов, использовали для амплификации фрагментов гена *ATM*. В гене *ATM* выявляли наличие однонуклеотидных замен: rs189037 (с. – 111G > A); rs228590 (с. 49238 C > T); rs1801516 (с. 5557G > A).

Для амплификации всех изучаемых фрагментов генов был подобран универсальный состав амплификационной смеси: 12,5 мкл «ArtMix ДНК-полимераза» («АртБиоТех», Беларусь); 0,2 мкл смеси эквивалентных концентраций прямого и обратного праймеров (100 мкМ); 0,6 мкл красителя ZUBrGreen для ПЦР-РВ («Праймтех», РБ); 8,7 мкл дезонизированной воды, 3 мкл выделенной ДНК. Общий объем амплификационной смеси составил 25 мкл.

Амплификацию ДНК проводили с применением специфических пар праймеров (прямого (F-forward) и обратного (R-reverse)) [1; 5], последовательности праймеров, температура отжига праймеров и методы анализа приведены в табл. 1.

После этапа амплификации для анализа полиморфизмов rs189037 и rs228590 в гене *ATM* проводили этап рестрикции с использованием ферментов *MscI* (rs189037) и *DraI* (rs228590) («СибЭнзим», РФ), затем анализ результатов методом электрофореза ампликонов в 3%-ом агарозном геле. Для выявления полиморфизма rs1801516 проводили анализ кривых плавления высокого разрешения (high-resolution melting – HRM).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ SPSS. Для описания частоты выявления признаков приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения. Доверительный интервал вычисляли по методу Уилсона (Wilson CI for proportion). Для сравнения категориальных признаков проводили анализ таблиц сопряженности с оценкой различий в частотах с использованием критерия χ^2 -Пирсона. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Результаты идентификации и анализа объединенного профиля полиморфных вариантов гена *ATM* у пациентов с ММ ($n = 50$) и лиц контрольной группы ($n = 30$), представлены в табл. 2.

В группе пациентов с ММ установлен высокий уровень распространенности полиморфизмов rs189037; rs228590; rs1801516 в гене *ATM* (68,00% (95 % ДИ (54,87; 79,58))). Среди

Таблица 1 – Последовательности праймеров
и методы анализа фрагментов гена *ATM*

№ rs	Замена	Последовательность праймера	Температура отжига	Метод анализа
rs189037	с. – 111G > A	F-GCTGCTTGGCGTTGCTTC	64	рестрикция
		R-CATGAGATTGGCGGTCTGG		
rs228590	с. 49238C > T	F-CAGAGCGAGACTGTCTCAAAACA	63	рестрикция
		R-AAGTCAGAAGAACACCAGTGAATT		
rs1801516	с. 5557G > A	F-AGATGGCTCTGATTCTCTCCT	57	плавление
		R-GCGGAAGTTGTAATAGTGTGGG		

Таблица 2 – Распространенность полиморфных вариантов гена *ATM* в группе пациентов с ММ и контрольной группе

Ген	Распространенность полиморфизмов				Значения χ^2 и p	
	Пациенты с ММ ($n = 50$)		Контрольная группа ($n = 30$)			
	n	%	n	%		
<i>ATM</i> rs189037; rs228590; rs1801516	34	68,00	4	13,33	$\chi^2=15,22$; $p = 0,001$	

пациентов контрольной группы распространность полиморфизмов в гене *ATM* составила 13,33 % (95 % ДИ (5,31; 29,68)). Частота выявления изученных полиморфизмов в гене *ATM* достоверно выше в группе пациентов с ММ в сравнении с результатами пациентов контрольной группы ($p = 0,001$).

Результаты, характеризующие частоту выявления различных генотипов и аллелей в составе полиморфизмов rs189037; rs228590; rs1801516 в гене *ATM* у пациентов с ММ и у лиц контрольной группы, представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Результаты выявления различных генотипов и аллелей в гене *ATM* у пациентов с ММ и у лиц контрольной группы

Полиморфизм	Генотип / Аллель	Распространенность полиморфизма				Значения χ^2 и p	
		Пациенты с ММ ($n = 50$)		Контрольная группа ($n = 30$)			
		n	%	n	%		
Генотип							
rs189037 c.-111G > A	GG	31	62,00	29	96,67	$\chi^2 = 10,21$ $p < 0,001$	
	GA	18	36,00	1	3,33		
	AA	1	2,00	0	0		
	Аллель	<i>n</i> = 100		<i>n</i> = 60			
	G	80	80,00	59	98,33	$\chi^2 = 11,41$ $p < 0,001$	
	A	20	20,00	1	1,67		
Генотип							
rs228590 c.49238C > T	CC	19	38,00	28	93,33	$\chi^2 = 14,09$ $p < 0,001$	
	CT	26	52,00	2	6,67		
	TT	5	10,00	0	0		
	Аллель	<i>n</i> = 100		<i>n</i> = 60			
	C	64	64,00	58	96,67	$\chi^2 = 12,42$ $p < 0,001$	
	T	36	36,00	2	3,33		
Генотип							
rs1801516 c.5557G > A	GG	36	72,00	29	96,67	$\chi^2 = 6,33$ $p = 0,01$	
	GA	13	26,00	1	3,33		
	AA	1	2,00	0	0		
	Аллель	<i>n</i> = 100		<i>n</i> = 60			
	G	85	85,00	59	98,33	$\chi^2 = 8,17$ $p = 0,01$	
	A	15	15,00	1	1,67		

В ходе анализа результатов, полученных при изучении частоты выявления полиморфизмов rs189037; rs228590; rs1801516 в гене *ATM* у пациентов контрольной группы доминирующими были дикие варианты генотипов, распространенность которых составила 93,33–96,67 %. Гомозиготных мутантных генотипов у пациентов контрольной группы не выявлено. Распространенность гетерозиготных генотипов 1,67–3,33%.

Среди пациентов группы с ММ для полиморфизмов с rs189037 (с. – 111G>A) и rs1801516 (с. 5557G > A) в гене *ATM* доминирующими

были гомозиготные дикие генотипы (62,00 и 72,00 % соответственно). Для данных полиморфизмов зафиксирована высокая распространенность гетерозиготных генотипов: 36,00 % для полиморфизма rs189037 и 26,00 % для полиморфизма rs1801516. Распространенность гомозиготных мутантных генотипов 2,00 % для каждого полиморфизма. В группе пациентов с ММ зафиксирована высокая частота выявления мутантных аллелей: для полиморфизма rs189037 – 20,00 %; и для полиморфизма rs1801516 – 15,00 %.



Распространенность мутантных аллелей в составе гетерозиготных и гомозиготных мутантных генотипов для всех изученных полиморфизмов (rs189037; rs228590; rs1801516) в гене *ATM* была достоверно выше в группе пациентов с ММ в сравнении с результатами пациентов контрольной группы ($p < 0,05$).

Заключение. У пациентов с ММ в ходе исследования установлен достоверно более высокий уровень распространенности полиморфизмов rs189037; rs228590; rs1801516 в гене *ATM*, в сравнении с пациентами контрольной группы

пы ($p < 0,05$). Среди пациентов контрольной группы не было выявлено носителей гомозиготных мутантных генотипов, а распространенность мутантных аллелей в составе гетерозиготных генотипов составила 1,67–3,33 %. Для пациентов с ММ установлено достоверное увеличение частоты однонуклеотидных замен в гене *ATM*, носительство мутантных аллелей в составе как гетерозиготных, так и гомозиготных мутантных генотипов, у пациентов данной группы зафиксировано на уровне от 15,00 % (для rs1801516) до 36,00 % (для rs228590).

Список цитированных источников

1. Wilson, T.K. In Silico Design of Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) Assay Probes for Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis, and Personalised Treatment / T.K. Wilson, O.T. Zishiri // Curr Issues Mol Biol. – 2025. – Vol. 47(4). – P. 292. doi: 10.3390/cimb47040292.
2. Estiar, M.A. ATM in breast and brain tumors: a comprehensive review / M.A. Estiar, P. Mehdiipour // Cancer Biol Med. – 2018. – Vol. 15(3). – P. 210–227. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0022.
3. Lee, J.H. Oxidative stress and the multifaceted roles of ATM in maintaining cellular redox homeostasis / J.H. Lee // Redox Biol. – 2024. – Vol. 75. – P. 103269. doi: 10.1016/j.redox.2024.103269.
4. Single nucleotide polymorphism in ATM gene, cooking oil fumes and lung adenocarcinoma susceptibility in Chinese female non-smokers: a case-control study / Shen L. [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9(5). – P. e96911. doi: 10.1371/journal.pone.0096911.
5. Functional promoter rs189037 variant of ATM is associated with decrease in lung diffusing capacity after irradiation for non-small-cell lung cancer / Lopez Guerra J.L. [et al.] // Chronic Dis Transl Med. – 2018. – Vol. 4(1). – P. 59–66. doi: 10.1016/j.cdtm.2018.02.006.
6. ATM rs189037 (G>A) polymorphism increased the risk of cancer: an updated meta-analysis / Zhao Z.L. [et al.] // BMC Med Genet. – 2019. – Vol. 20(1). – P. 28. doi: 10.1186/s12881-019-0760-8.
7. SDC4-rs1981429 and ATM-rs228590 may provide early biomarkers of breast cancer risk / Vuorinen S.I. [et al.] // J Cancer Res Clin Oncol. – 2023. – Vol. 149(8). – P. 4563–4578. doi: 10.1007/s00432-022-04236-2.

STUDY THE PREVALENCE OF POLYMORPHISMS IN THE *ATM* GENE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

¹Rudenkova T.V., ¹Kostiuk S.A., ¹Klimkovich N.N., ²Kozich J.M.

¹Educational institution “Belarusian State Medical University”, Minsk, The Republic of Belarus

²State Institution “Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology”, Gomel, The Republic of Belarus

The study revealed a significantly higher prevalence of the rs189037; rs228590; rs1801516 polymorphisms in the *ATM* gene in patients with multiple myeloma compared with healthy individuals in the control group ($p < 0,05$). No carriers of homozygous mutant genotypes were found among patients in the control group, and the prevalence of mutant alleles in heterozygous genotypes was 1,67–3,33 %. For patients with multiple myeloma, carriage of mutant alleles was found in both heterozygous and homozygous mutant genotypes. The prevalence of mutant alleles in the rs189037; rs228590; rs1801516 polymorphisms in the *ATM* gene ranged from 15,00 % to 36,00 % in patients with multiple myeloma.

Keywords: multiple myeloma; polymorphism; gene; *ATM*.