

С. С. Сиротина<sup>1</sup>, Т. С. Тикунова<sup>1</sup>, К. И. Процаев<sup>2</sup>, О. А. Ефремова<sup>1</sup>, И. В. Батлуцкая<sup>1</sup>,  
Т. И. Якунченко<sup>1</sup>, Ф. И. Собянин<sup>1</sup>, М. И. Чурносков<sup>1</sup>, С. М. Алексеев<sup>2</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ У ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА\*

<sup>1</sup> Белгородский государственный национальный исследовательский университет,  
308015 Белгород, ул. Победы, д. 85, корп. 10; <sup>2</sup> Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология»,  
107000 Москва, ул. Б. Дмитровка, д. 9, стр. 3; e-mail: prashchayeu@bsu.edu.ru

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — мультифакториальное заболевание, в развитии которого важную роль играют гены цитокинов, в частности интерлейкины. Этим видом лейкоза болеют чаще люди пожилого возраста. Цель исследования заключалась в оценке ассоциаций генетических полиморфизмов интерлейкинов с развитием ХЛЛ среди жителей разного возраста Центрально-Черноземного региона России. Генотипирование –889С/Т IL-1A, –590С/Т IL-4 и VNTR IL-1Ra проведено у 206 пациентов с ХЛЛ и 307 лиц контрольной группы. В результате получено, что генетическим фактором риска формирования ХЛЛ является аллель –590Т IL-4 (OR=1,45). Развитие тромбоцитопении у больных ХЛЛ связано с генетическими вариантами –889Т IL-1A (OR=1,95), –889ТТ IL-1A (OR=6,32) и IL-1Ra\*1 (OR=2,32).

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз, возраст, генетический полиморфизм, интерлейкины, тромбоцитопения

Проблема лейкозов является одной из важных в современной медицине. В мире наблюдается непрерывный рост заболеваемости лейкозами [11]. При этом одной из наиболее распространенных форм является хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), а чаще им болеют люди пожилого возраста. Это опухолевое заболевание лимфатической ткани, в основе развития которого лежит моноклоновая пролиферация патологических лимфоидных элементов [10]. Ежегодная заболеваемость ХЛЛ составляет 2,5–3 на 100 тыс. населения, а для лиц старше 60 лет — до 10 на 100 тыс. населения [20, 25]. Течение ХЛЛ характеризуется развитием инфекционных (у 85 % пациентов), цитопенических осложнений — анемия (15–30 %) и тромбоцитопения (5–15 %), снижающих продолжительность

жизни больных [22]. С учетом возрастных изменений в организме, для пожилых людей эти факторы могут оказаться более фатальными, чем для людей молодого возраста.

Изучение факторов, определяющих формирование ХЛЛ, продолжает оставаться в центре внимания отечественных и зарубежных ученых [4, 6, 19, 20]. Как свидетельствуют результаты ряда исследований [5, 29], значимую роль в развитии ХЛЛ играют генетические факторы. Среди генов-кандидатов, регулирующих, преимущественно, процессы неспецифической защиты организма, гемопоэза, апоптоза и опухолевой прогрессии, большое значение для хронического лимфолейкоза имеют гены интерлейкинов [1, 15, 31]. Интерлейкины — полипотентные вещества белковой природы, обладающие множественными биологическими эффектами. Являясь начальным звеном активации иммунного ответа, они определяют эффективность и тип иммунного реагирования, принимают непосредственное участие в регуляции апоптотных и аутоиммунных процессов [9, 24].

Клинико-генетические работы, посвященные молекулярно-генетическим аспектам ХЛЛ, в России немногочисленны и затрагивают, преимущественно, гены факторов некроза опухолей и детоксикации [2, 3, 12, 16]. Роль полиморфных генетических маркеров интерлейкинов в отношении ХЛЛ в нашей стране мало изучена. Поэтому целью исследования явилось изучение ассоциаций генетических полиморфизмов интерлейкинов с развитием ХЛЛ среди жителей разного возраста Центрально-Черноземного региона России.

\* Работа выполнена в рамках государственного задания ФГАОУВПО «НИУ БелГУ» на 2014 г. (тема проекта — изучение генетических факторов риска развития мультифакториальных заболеваний человека).

## Материалы и методы

Анализ молекулярно-генетических маркеров проводили на материале двух выборок — 206 больных ХЛЛ и 307 человек популяционного контроля. В выборки больных и популяционного контроля включали индивидуумов русской национальности, являющихся уроженцами Центрально-Черноземного региона России и не имеющих родства между собой. Пациентов включали в соответствующую группу больных только после установления диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования. Диагноз ХЛЛ устанавливали при абсолютном количестве лимфоцитов в крови более  $5 \cdot 10^9/\text{л}$ , наличии в костномозговом пунктате не менее 30 % лимфоцитов и иммунологическом подтверждении клонового В-клеточного характера лимфоцитоза [14]. Клинико-лабораторное обследование больных проводили на базе отделения гематологии Белгородской областной клинической больницы. В группу популяционного контроля включали лиц без гематологических заболеваний. Среди 206 больных ХЛЛ мужчин было 114 (55,33 %), женщин — 92 (44,67 %). В популяционной выборке ( $n=307$ ) распределение по полу было аналогичным — 162 мужчины (51,95 %), 145 женщин (48,05 %),  $p > 0,05$ ; средний возраст больных —  $65,46 \pm 9,69$  года (34–88 лет), популяционной выборки —  $62,20 \pm 6,28$  года (28–79 лет),  $p > 0,05$ . Таким образом, группа популяционного контроля не отличалась от группы больных как по полу, так и по возрасту. С точки зрения возрастного анализа, в выборке представлены лица разного возраста — молодого, зрелого, пожилого и старческого, средний возраст лежит в плоскости пожилого возраста.

Всем больным с ХЛЛ и лицам популяционного контроля проводили типирование четырех молекулярно-генетических маркеров интерлейкинов: *IL-1A* (–889С/Т *IL-1A*), *IL-4* (–590С/Т *IL-4*) и антагониста рецептора *IL-1* (*VNTR IL-1Ra*). Выбор данных интерлейкинов для исследования обусловлен их важным патогенетическим значением для ХЛЛ [1, 19, 31].

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8–9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции [23]. Анализ всех локусов осуществляли методом ПЦР синтеза ДНК. Генотипирование ДНК-маркеров производили

следующими методами: анализ полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов (*VNTR IL-1Ra*) [28], анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (–889С/Т *IL-1A*) [30] и анализ дискриминации аллелей методом *TagMan* зондов (–590С/Т *IL-4*) [28].

Формирование базы данных и статистические расчеты осуществляли с использованием программы Statistica 6.0. Определение фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [7, 26]. Ассоциации аллелей и генотипов изученных ДНК-маркеров с формированием ХЛЛ и его патогенетически значимыми признаками оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности  $2 \times 2$  с расчетом критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса на непрерывность и отношения шансов (*OR*) с 95 % доверительным интервалом (*ДИ*) [13]. При множественных сравнениях для минимизации ошибок первого рода, связанных с получением ложноположительных результатов, использовали поправку Бонферрони [13].

## Результаты и обсуждение

В результате проведенного сравнительного анализа распределения рассматриваемых генетических полиморфизмов установлена более высокая частота аллеля –590Т *IL-4* (24,51 %) среди больных ХЛЛ по сравнению с контрольной группой, где его распространенность составила 18,24 % ( $\chi^2=5,52$ ,  $p=0,02$ ), *таблица*. По другим исследуемым генетическим полиморфизмам достоверных различий в концентрациях аллелей и генотипов не обнаружено ( $p > 0,05$ ).

Известно, что полиморфизм –590С/Т в промоторном регионе гена *IL-4* определяет уровень продукции *IL-4*, промотор с заменой –590Т является более активным, менее прочно связывается с транскрипционными факторами, а генетический вариант –590С *IL-4* чаще подвергается транскрипции, то есть является высокопродуктивным [8]. *IL-4* относится к группе противовоспалительных цитокинов, оказывает действие на регуляцию образования других цитокинов посредством участия в многочисленных биологических процессах, таких как иммунный ответ и воспалительные реакции [17]. Наряду с этим, известна способность *IL-4* участвовать в механизмах защиты клеток от апоптоза. Полагают, что это может быть прямое антипролиферативное действие, обусловленное блокадой клеточного цикла, или его способностью снижать экспрессию некоторых цитокинов [18], и,

**Сравнительный анализ частот аллелей полиморфных маркеров генов интерлейкинов у больных ХЛЛ и в контрольной группе**

Локусы	Аллели, генотипы	Больные ХЛЛ, n=206		Контрольная группа, n=307		$\chi^2$ (p)	OR (95 % ДИ)
		абс. число	%	абс. число	%		
-889C/T IL-1A (rs1800587)	-889C	298	73,76	468	77,23	2,08 (0,14)	0,79 (0,59–1,08)
	-889T	106	26,24	138	22,77		1,21 (0,89–1,63)
VNTR IL-1Ra	IL-1Ra*1	306	74,27	405	70,31	1,67 (0,19)	1,22 (0,91–1,63)
	IL-1Ra*2	93	22,57	154	26,74	1,50 (0,22)	0,79 (0,58–1,08)
	IL-1Ra*4	12	2,91	16	2,78	0,01 (1,00)	1,05 (0,46–2,37)
	IL-1Ra*5	1	0,24	1	0,28	0,01 (1,00)	1,39 (0,03–50,89)
-590 C/T IL-4 (rs 2243250)	-590C	311	75,49	502	81,76	5,52 (0,02)	0,68 (0,50–0,94)
	-590T	101	24,51	112	18,24		1,45 (1,06–1,99)

следовательно, *IL-4* имеет важное значение в патогенезе ХЛЛ. Итак, у индивидуумов с низкопродуктивным генетическим вариантом *-590T IL-4* можно ожидать снижения противоопухолевого и противовоспалительного эффектов, что может обусловить повышенный риск формирования ХЛЛ. Этот факт мы и зарегистрировали в нашем исследовании.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли полиморфного генетического маркера *-590C/T IL-4* в формировании предрасположенности к ХЛЛ, фактором риска развития которого является аллель *-590T IL-4* (OR=1,45).

В исследуемой нами выборке (n=202) на момент обследования осложнения были зарегистрированы у 57 (28,21%) пациентов, в том числе цитопенические осложнения наблюдали у 41 (анемия — 6,93%, тромбоцитопения — 13,36%), септические — у 5 (2,57%) и сочетание осложнений было выявлено у 11 (5,44%).

Установлено, что пациенты с развившейся тромбоцитопенией на момент обследования отличаются максимальной концентрацией молекулярно-генетических маркеров *-889T IL-1A* (36,54%), рис. 1, и *-889TT IL-1A* (19,24%), рис. 2, что статистически достоверно превышает показатели контрольной группы (22,77%,  $\chi^2=4,26$ ,  $p=0,03$ , OR=1,95; 95% ДИ 1,03–3,67 и 3,63%,  $\chi^2=9,44$ ,  $p=0,003$ , с учетом поправки Бонферрони  $p_{\text{сф}}=0,009$ , OR=6,32; 95% ДИ 1,72–22,28, соответственно).

Также у пациентов с развившейся тромбоцитопенией на момент обследования выявлена высокая частота аллеля *IL-1Ra\*1* (84,62%) по сравнению с контрольной группой (70,31%,  $\chi^2=4,11$ ,  $p=0,04$ , OR=2,32; 95% ДИ 1,02–5,46), рис. 3.

Таким образом, генетическими факторами риска развития тромбоцитопении у больных ХЛЛ являются полиморфизмы *-889C/T IL-1A* и *VNTR IL-1Ra*.

Согласно литературным данным, увеличение числа повторов ведет к повышению транскрипционной активности *IL-1Ra* [17]. *IL-1Ra\*1* являет-

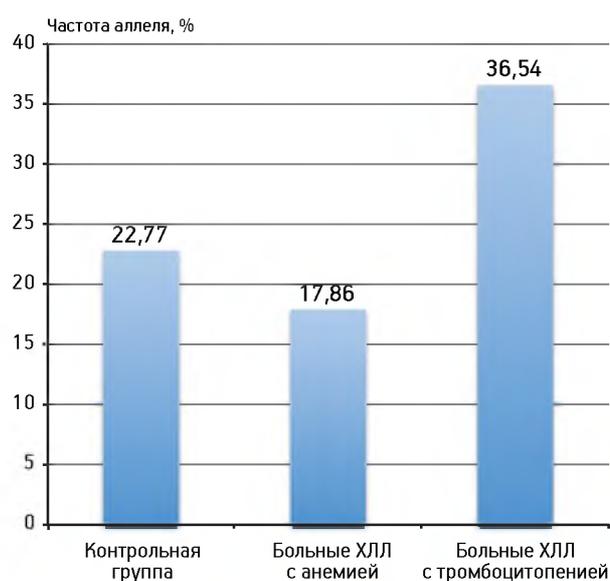


Рис. 1. Частота аллеля *-889T IL-1A* среди больных ХЛЛ в зависимости от наличия цитопенических осложнений на момент обследования и в контрольной группе

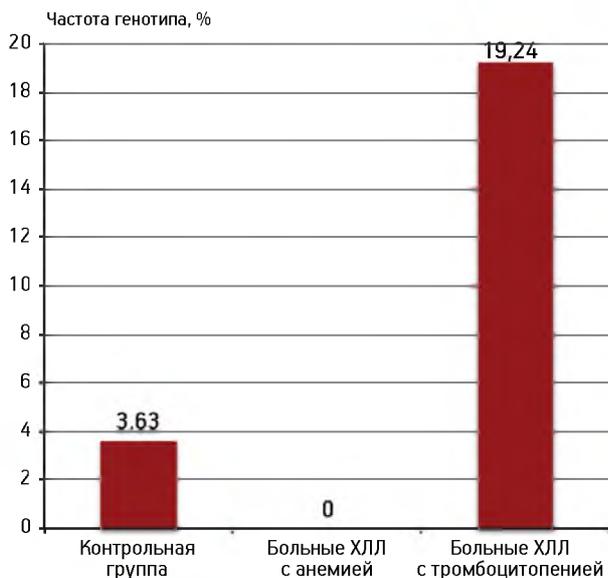


Рис. 2. Частота генотипа  $-889TT$   $IL-1A$  среди больных ХЛЛ в зависимости от наличия цитопенических осложнений на момент обследования и в контрольной группе

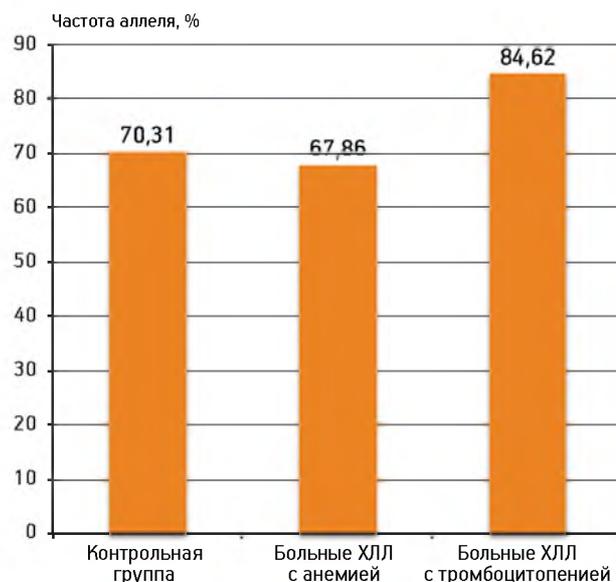


Рис. 3. Частота аллеля  $IL-1Ra^*1$  среди больных ХЛЛ в зависимости от наличия цитопенических осложнений на момент обследования и в контрольной группе

ся низкопродуктивным аллелем, что обуславливает ослабление противовоспалительного действия и нарушение противоопухолевого ответа у пациентов с ХЛЛ.

Следует отметить, что исследованный полиморфизм  $-889C/T$   $IL-1A$  лежит в промоторной последовательности гена и может затрагивать уровень белковой экспрессии. Из работы В. Nutyrová (2002) следует, что у здоровых лиц, гомозиготных по аллелю  $-889T$   $IL-1A$ , плазменные уровни  $IL-1A$  увеличены по сравнению с носителями других генотипов. При этом, согласно литературным данным, ряд опухолевых клеток обладает способностью продуцировать  $IL-1A$ , в связи с чем полагают, что продукция  $IL-1A$  может способствовать пролиферации последних. Последнее может приводить (при повышенной продукции  $IL-1A$ ) к нарушению реализации противоопухолевого ответа и обуславливать, в конечном итоге, более тяжелое течение заболевания [8, 21, 27]. Этот факт помогает объяснить разное течение заболевания у людей старших возрастных групп.

### Заключение

Таким образом, в результате исследования выявлены молекулярно-генетические маркеры интерлейкинов, которые ассоциированы с формированием хронического лимфолейкоза и развитием тромбоцитопении. Так, фактором риска формирования хронического лимфолейкоза является аллель

$-590T$   $IL-4$  ( $OR=1,45$ ). Факторами риска возникновения тромбоцитопении у больных хроническим лимфолейкозом являются генетические варианты  $-889T$   $IL-1A$  ( $OR=1,95$ ),  $-889TT$   $IL-1A$  ( $OR=6,32$ ) и  $IL-1Ra^*1$  ( $OR=2,32$ ). Эти данные будут способствовать выбору тактики лечения больных с хроническим лимфолейкозом, которая будет выработываться с двух позиций — возраста пациента и особенностей генетического статуса.

### Литература

1. Антонеева И.И., Бойчук С.В., Белевцев М.В. и др. Онкоиммунология, гемобластозы // Мед. иммунология. 2007. Т. 9. № 2–3. С. 272–292.
2. Бакиров Б.А., Гринчук О.В., Якупова Э.В. и др. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма генов интерлейкина-6, факторов некроза опухоли альфа и бета и глутатион-S-трансферазы M1 у больных хроническим лимфолейкозом // Гематология и трансфузиология. 2005. Т. 50. № 1. С. 18–22.
3. Бакиров Б.А., Каримов Д.О., Викторова Т.В. Поиск генетических маркеров прогнозирования и развития хронического лимфолейкоза // Креативная хир. и онкол. 2010. № 4. С. 68–70.
4. Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Грецов Е.М. и др. Экспрессия липопротеинлипазы — эффективный показатель прогноза В-клеточного хронического лимфолейкоза // Гематология и трансфузиология. 2008. Т. 53. № 5. С. 67–70.
5. Гранов А.М., Молчанов О.Е. Канцерогенез и иммунология опухоли. Фундаментальные и клинические аспекты // Вопр. онкол. 2008. Т. 54. № 4. С. 401–409.
6. Данилова Н.В., Хлевная Н.В., Сердюк О.Д. и др. Особенности возникновения вторых злокачественных опухолей у больных гемобластозами // Кубан. науч. мед. вестн. 2009. № 6. С. 100–103.
7. Животовский Л.А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях. Общая генетика: Гос.

ком. Совета Министров СССР по науке и технике, АН СССР, ВИНТИ. М., 1969–1991. Т. 8: Теоретическая популяционная генетика. М., 1983. С. 76–104.

8. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практич. онкол. 2003. Т. 4. № 3. С. 131–139.

9. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008.

10. Лабораторная гематология: Учеб. пособие / Под ред. С. А. Луговой и др. М.: Юнимед-пресс, 2002.

11. Никитин Е.А. Хронический лимфолейкоз // Клин. онкогематол. Фунд. исслед. и клин. практика. 2009. Т. 2. № 1. С. 87–91.

12. Овсепян В.А., Росин В.А., Загоскина Т.П. Анализ полиморфизма генов CYP1A1, GSTM1, GSTT1 и GSTP1 при В-клеточном хроническом лимфолейкозе // Мед. генетика. 2010. Т. 9. № 4. С. 25–29.

13. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М.: Медиа Сфера, 2006.

14. Руководство по гематологии (в 3-х т.) / Под ред. А. И. Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2002–2005.

15. Сиротина С.С., Тикунова Т.С., Прощаев К.И. и др. Клинические ассоциации генетических вариантов интерлейкинов с формированием хронического лимфолейкоза у пациентов старших возрастных групп // Клин. мед. 2013. Т. 91. № 11. С. 47–52.

16. Тикунова Т. С. Изучение молекулярно-генетического маркера +36 A/G TNFR1 у больных хроническим лимфолейкозом // Вестн. РГМУ. 2011. № 1 (спец. вып.). С. 72.

17. Чайковский А.В., Михеева К.О. Роль аллельного полиморфизма гена IL-4 в иммунопатогенезе герпетической инфекции // В сб.: Материалы Всерос. 68-й Итоговой студенч. науч. конф. им. Н.И. Пирогова. Томск, 2009. С. 320–321.

18. Шабалдин А.В., Филипенко М.Л., Симонова Т.А. Полиморфизм генов антагониста рецептора интерлейкина-1 и интерлейкина-4 при репродукционных нарушениях // Иммунология. 2005. Т. 26. № 1. С. 6–9.

19. Bianchi S., Moreno P., Landoni A.I. et al. Immunoglobulin heavy chain V-D-J gene rearrangement and mutational status in Uruguayan patients with chronic lymphocytic leukemia // Leuk. Lymphoma. 2010. Vol. 51. № 11. P. 2070–2078.

20. Eichhorst B., Hallek M., Dreyling M. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO clinical recommendation for diagnosis, treatment and follow-up // Ann. Oncol. 2008. Vol. 19 (Suppl. 2). P. i60–i62.

21. Hutyrová B., Pantelidis P., Drábek J. et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis // Amer. J. Respir. Crit. Care Med. 2002. Vol. 165. № 2. P. 148–151.

22. Malavasi F., Deaglio S., Damle R. et al. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later // Blood. 2011. Vol. 118. № 13. P. 3470–3478.

23. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods. Mol. Biol. 1985. Vol. 2. P. 31–34.

24. Peiro A.M., Tang Ch.M., Chou D. et al. Phosphodiesterase 7B gene promoter polymorphism in patients with chronic lymphocytic leukemia // FASEB J. 2008. Vol. 22 (Meeting Abstract Suppl.). Art. 1134.7.

25. Quiney C., Billard C., Faussat A.M. et al. Hyperforin inhibits P-glyc and BCRP activities in chronic lymphocytic leukemia cells and myeloid cells // Leuk. Lymphoma. 2007. Vol. 48. № 8. P. 1587–1599.

26. Schlesselman J.J. Case-control studies: design, conduct, analysis. New York: Oxford University Press, 1982.

27. Sehoul J., Mustea A., Koensgen D. et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism is associated with increased risk of epithelial ovarian cancer // Ann. Oncol. 2003. Vol. 14. № 10. P. 1501–1504.

28. Steinbrugger I., Haas A., Maier R. et al. Analysis of inflammation- and atherosclerosis-related gene polymorphisms in branch retinal vein occlusion // Mol. Vis. 2009. Vol. 15. P. 609–618.

29. Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor // Blood. 2004. Vol. 103. № 12. P. 4389–4395.

30. Trevisatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., Brito R.B. et al. Polymorphisms in the IL-1a and IL-1b Genes are not associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Brazilian population // Braz. J. Oral. Sci. 2003. Vol. 2. № 7. P. 348–352.

31. Zenz T., Mertens D., Döhner H. et al. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia // Blood Rev. 2011. Vol. 25. № 3. P. 131–137.

S.S. Siroolina<sup>1</sup>, T.S. Tikunova<sup>1</sup>, K.I. PRashchayeu<sup>2</sup>, O.A. Efremova<sup>1</sup>, I.V. Battluskaya<sup>1</sup>,  
T.I. Yakunchenko<sup>1</sup>, F.I. Sobyatin<sup>1</sup>, M.I. Churnosov<sup>1</sup>, S.M. Alekseev<sup>2</sup>

#### STUDY OF THE ROLE OF GENETIC POLYMORPHISMS INTERLEUKINS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN PATIENTS OF DIFFERENT AGES

<sup>1</sup> Belgorod State National Research University, 85, bld. 10, ul. Pobedy, Belgorod 308015; <sup>2</sup> Research Medical Center «Gerontology», 9, bld. 3, ul. B. Dmitrovka, Moscow 107000; e-mail: prashchayeu@bsu.edu.ru

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a multifactorial disease, in which development the important role played the cytokine genes, in particular interleukins. This type of leukemia is more common in the elderly. The purpose of the study was to evaluate the association of genetic polymorphisms of interleukin with the development of chronic lymphocytic leukemia among residents of the Central Chernozem region of Russia. Genotyping of the –889C/T IL-1A, –590C/T IL-4 and VNTR IL-1Ra was conducted in 206 patients with CLL and 307 individuals of the control group. The study found that the genetic risk factor for the development of CLL is allele –590T IL-4 (OR=1,45). The development of thrombocytopenia in patients with CLL is associated with genetic variants –889T IL-1A (OR=1,95), –889TT IL-1A (OR=6,2) and IL-1Ra\*1 (OR=2,32).

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia, age, genetic polymorphism, interleukins, thrombocytopenia