

© Коллектив авторов, 2015 г.
УДК 616-006.446-036.12:612.017.1

**Е. Л. Назарова, В. И. Шардаков,
В. Т. Демьянова, И. А. Докшина,
Е. Н. Зотина**

МОДИФИКАЦИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ТЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФО- ЛЕЙКОЗА

Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

ВВЕДЕНИЕ

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является самым частым видом гемобластозов у взрослых, преимущественно лиц пожилого возраста. В настоящее время важное этиопатогенетическое значение при ХЛЛ придается нарушению баланса между апоптозом и пролиферацией лимфоидных клеток, где значимую роль играют генетические факторы, влияющие на развитие и прогрессирование заболевания [11, 17]. Показано, что однонуклеотидные замены (single-nucleotide polymorphism — SNPs) в генах врожденного иммунного ответа, локализованные в промоторном регионе, влияют на конечный уровень секреции или экспрессии белка, кодируемого этим геном, а также на функциональную активность этого белка, и ассоциированы с риском развития опухолей лимфа-

тической системы [3, 6, 12, 19]. Ряд исследователей указывают на то, что SNPs в данных генах могут влиять на клиническое течение заболевания [2, 6, 8, 10, 14, 17], которое весьма вариабельно: от «тлеющего» до прогрессирующего. С молекулярно-генетических позиций ХЛЛ изучен недостаточно полно. Подавляющее число исследований роли различных генов-кандидатов в формировании риска развития хронического лимфолейкоза проведено зарубежом [6, 10, 17]. В Российской Федерации лишь несколько исследований посвящено молекулярно-генетическим аспектам данного заболевания, причем основное внимание в этих работах уделено генам системы детоксикации ксенобиотиков [4, 5]. Роль иных генетических факторов, определяющих течение ХЛЛ, среди населения России изучена мало.

Целью исследования являлась оценка мутационного статуса генов иммунного ответа в качестве критериев прогноза у пациентов с доброкачественной и прогрессирующей формой течения ХЛЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен ретро- и проспективный анализ историй заболевания 30 больных ХЛЛ, жителей Кировской области, идентифицирующих себя как русские. В исследование вошли пациенты, у которых диагноз заболевания был установлен на основании классических критериев диагностики в период с 2001 по 2013 г. Среди них 17 мужчин и 13 женщин (соотношение 1,3:1). Исследования, проведенные у больных, одобрены локальным этическим комитетом и выполнены в соответствии с законодательством Российской Федерации. Характеристика обследованных пациентов приведена в табл. 1.

В изучаемых группах не выявлено гендерных и возрастных отличий показателей, а также сроков начала лечения и бессобытийной выживаемости. В 15,4 % случаев прогрессирующее течение заболевания установлено у пациентов в момент постановки диагноза уже в стадии С, что не наблюдалось при доброкачественном течении процесса. Найдены отличия в выживаемости, зависящей от заболевания (с учетом случаев смерти непосредственно от ХЛЛ), между I и II группами пациентов (100 vs. 61,5 %, $\chi^2 = 7,85$, $p = 0,0051$): за период наблюдения умерли 5 больных с прогрессирующим ХЛЛ вследствие переходя заболевания в терминальную фазу.

Т а б л и ц а 1

Характеристика больных хроническим лимфолейкозом

Показатель	Доброкачественная форма (n = 17)	Прогрессирующая форма (n = 13)
Пол: мужской женский соотношение	10 (58,8 %) 7 (41,2 %) 1,4:1	7 (53,9 %) 6 (46,1 %) 1,2:1
Возраст на момент постановки диагноза, лет, Ме (25–75 %)	56 (54–64)	58 (58–73)
Стадия ХЛЛ на момент постановки диагноза по J. L. Binet et al. [7]: А В С	2 (11,8 %) 15 (88,2 %) 0 (0 %)	0 (0 %) 11 (84,6 %) 2 (15,4 %)
Количество пациентов, нуждающихся в лечении на момент постановки диагноза	11 (64,7 %)	10 (76,9 %)
Период наблюдения от момента постановки диагноза до начала терапии, мес., Ме (25–75 %)	19 (8–34)	12 (4–12)
Общая выживаемость (количество больных)	17 (100 %)	8 (61,5 %)*
Бессобытийная выживаемость, мес., Ме (25–75 %)	25 (23–36)	36 (14–60)

Примечание: Ме – медиана показателя; в скобках – 25–75 % – верхний и нижний квартили; * – достоверность различий показателя в группах больных ХЛЛ.

Таблица 2

Распределение полиморфных локусов генов иммунного ответа

Ген	Полиморфный локус	Цитогенетическая локализация	RS number
<i>IL1β</i>	T-31C	2q13-2q14	rs2856841
	G-1473C		rs1143623
	C-3953T		rs1143634
	T-511C		rs16944
<i>IL2</i>	T-330G	4q26-4q27	rs2069762
<i>IL4</i>	C-589T	5q23-5q31	rs2243250
<i>IL6</i>	C-174G	7p15-7p21	rs1800795
<i>IL10</i>	C-819	1q31-1q32	rs1800871
	G-1082A		rs1800896
<i>IL17A</i>	G-197A	6p12.2	rs2275913
<i>TNF</i>	G-308A	6p21.33	rs1800629
<i>CD14</i>	C-159T	5q31.1	rs34424920
<i>FCGR2A</i>	His166Arg	1q23.3	rs1801274
<i>TLR2</i>	Arg753Gln	4q31.3-4q32	rs5743708
<i>TLR3</i>	Phe421Leu	4q35.1	rs3775291
<i>TLR4</i>	Thr399Ile	9q32-9q33	rs4986791
<i>TLR6</i>	Ser249Pro	4p14	rs5473810
<i>TLR9</i>	T-1237C	3p21.2	rs5743836
	A2848G		rs352140

Примечание: RS number – идентификационный номер однонуклеотидной замены согласно "The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)" ("National Center for Biotechnology Information" (NCBI) [15], "National Human Genome Research Institute" (NHGRI) [16]).

Геномное тестирование 19 полиморфных участков 14 генов иммунного ответа (интерлейкина (*IL*) *1 β* , *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *IL17A*, фактора некроза опухоли (*TNF*), толлподобного рецептора (*TLR*) *2*, *TLR3*, *TLR6*, *TLR9*, а также *CD14* и *FCGR2A*) (табл. 2) проводили методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами и электрофоретической детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди – Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для расчета результатов использовали пакет программ «Statistica V.12» и «MS Office Excel 2003». Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Анализ межгенных взаимодействий выполнялся с помощью непараметрической программы методом редукции мультифакторных пространств (MDR – Multifactor Dimensionality Reduction) [18], в том числе с использованием ее модифицированной версии GMDR (Generalized Multifactor Dimensionality Reduction) [9, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведена оценка генетической компоненты в развитии и течении ХЛЛ, для чего была изучена частота распространения аллелей и генотипов генов иммунного ответа при доброкачественном и прогрессирующем течении заболевания. Установлен ряд отличий, характерных для доброкачественного течения ХЛЛ. В частности, у таких пациентов достоверно чаще выявлялись мутантный аллель А гена *TNF* (G-308A) (28,1 vs. 7,7 %; $\chi^2 = 3,90$; $p = 0,05$; OR = 4,70 (95 % CI: 0,92 – 24,10)); мутантный аллель С гена *TLR9* (T-1237C) (25,0 vs. 3,8 %; $\chi^2 = 4,90$; $p = 0,03$; OR = 8,33 (95 % CI: 0,97 – 71,76)); мутантный аллель А гена *TLR2* (Arg753Gln) (50,0 vs. 15,4 %; $\chi^2 = 3,80$; $p = 0,05$; OR = 5,50 (95 % CI: 0,91 – 33,18)). В то же время реже обнаруживался аллель «дикого типа» С гена *IL6* (C-174G) (12,5 vs. 46,2 %; $\chi^2 = 4,07$; $p = 0,04$; OR = 6,00 (95 % CI: 0,95 – 37,77)).

Известно, что анализ ассоциаций отдельных полиморфных вариантов генов не дает достаточно полного представления о механизмах формирования предрасположенности к тому или иному варианту течения заболевания, так как в основе развития гемобластозов лежат сложные межгенные и ген-средовые взаимодействия, которые необходимо учи-

тывать при прогнозировании риска развития неблагоприятного течения процесса [1]. Поэтому было проанализировано межгенное взаимодействие генотипов в двухлокусных и мультилокусных моделях.

На рис. 1 показана дендрограмма, отражающая кластерную структуру избранных генов у больных ХЛЛ.

Сильный антагонистический эффект предполагается для локусов *TNF* (G-308A) и *TLR2* (Arg753Gln), а также локусов *TLR9* (T-1237C) и *IL6* (C-174G), но в меньшей степени, чем для первой пары.

При анализе межгенных взаимодействий среди всех моделей выявленных генов-предикторов возможного развития прогрессирующего течения ХЛЛ наиболее значимыми оказались сочетания гаплотипов в двух- и трехлокусной моделях. Так, при наличии генотипа ТТ гена *TLR9* (T-1237C) в сочетании с генотипом GG гена *TLR2* (Arg753Gln) риск развития прогрессирующей формы заболевания возрастал в 23,8 раза ($\chi^2 = 6,23$; $p = 0,01$; OR = 23,83 (95 % CI: 1,50 – 377,42)), а при сочетании вышеуказанных гаплотипов с генотипом GG гена *TNF* (G-308A) – в 36 раз ($\chi^2 = 6,70$; $p = 0,01$; OR = 36,00 (95 % CI: 1,43 – 905,40)).

С помощью программы «MDR» проведен кластерный анализ четырехлокусной модели и построена радиальная диаграмма (рис. 2), отражающая вклад полиморфизма каждого гена в развитие прогрессирующей формы ХЛЛ.

Сильный антагонистический эффект показан для локусов *TLR9* (T-1237C) и *TNF* (G-308A), *TNF*

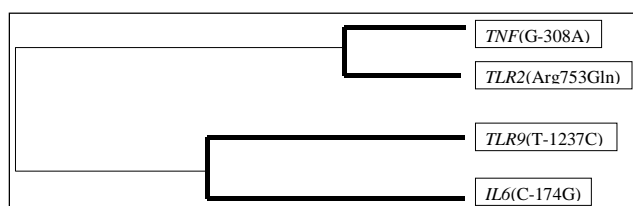


Рис. 1. Дендрограмма кластерной структуры взаимодействия генов *TNF*, *TLR9*, *TLR2*, *IL6* у больных ХЛЛ: короткая линия — сильное взаимодействие генных локусов; длинная — слабая связь; толстая линия — антагонизм эффектов отдельных локусов с большей степенью влияния; тонкая — антагонизм отдельных локусов с меньшей степенью воздействия

(G-308A) и *TLR2* (Arg753Gln), *TLR2* (Arg753Gln) и *IL6* (C-174G), *IL6* (C-174G) и *TLR9* (T-1237C), меньший — для *TNF* (G-308A) и *IL6* (C-174G). Наблюдалась весьма сильная синергичная связь между локусами *TLR9* (T-1237C) и *TLR2* (Arg753Gln), а учитывая весьма значимый удельный вес каждого локуса (от 10,00 % для *TLR2* до 16,65 % для *TLR9*), можно отметить их равное участие в предрасположенности к неблагоприятному течению ХЛЛ.

В работе проведена идентификация полиморфных вариантов генов иммунного ответа у больных ХЛЛ с различной скоростью прогрессии заболевания. Установлен ряд корреляционных связей распределения модификационных профилей генов

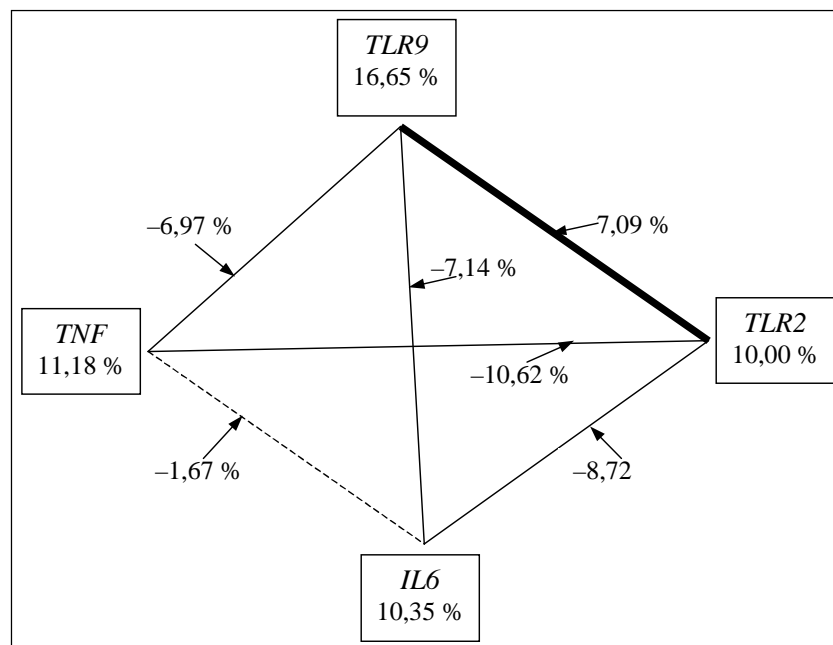


Рис. 2. Межгенные взаимодействия генов *TNF*, *TLR9*, *TLR2*, *IL6* в формировании риска развития прогрессирующего характера течения ХЛЛ: толстая линия — высокая степень взаимодействия (синергизм); тонкая — антагонизм; пунктирная — промежуточный этап между совместными действиями и избыточностью (или отсутствием связи, или независимостью эффектов отдельных локусов)

при доброкачественной и прогрессирующей форме ХЛЛ. Так, на доброкачественный характер течения ХЛЛ и, следовательно, выживаемость пациентов уже в момент постановки диагноза может указывать присутствие мутантных аллелей генов *TNF*, *TLR9* и *TLR2*, а также низкая частота выявления аллеля «дикого типа» гена *IL6*. Кроме того, определение комбинации нормальных гомозигот генов *TNF*, *TLR9* и *TLR2* коррелирует с возможным развитием прогрессирующей формы заболевания. Таким образом, использование данных прогностических факторов в клинической практике может способствовать оптимизации выбора терапии. Из всех проанализированных одиночных замен нуклеотидов в качестве дополнительных прогностических критериев можно рекомендовать исследование полиморфных вариантов генов *TNF*, *TLR2*, *TLR9* и *IL6*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батожаргалова Б. Ц. Клинико-эпидемиологические, генетические и этнические особенности бронхиальной астмы у подростков Забайкалья: дис. ... д-ра мед. наук. — М., 2013. — 284 с.
2. Ворopaева Е. Н. Клиническое значение делеции гена *CCR5* у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами / Е. Н. Ворopaева, Н. В. Скворцова, М. И. Воевода, З. В. Тарновский // Бюллетень СО РАМН. — 2011. — № 2. — С. 26—30.
3. Иванов А. М., Камилова Т. А., Никитин В. Ю. и др. Полиморфизм рецепторов врожденного иммунитета // Вестник Росс. военно-мед. акад. — 2009. — № 1. — С. 172—84.
4. Овсепян В. А., Росин В. А., Баранчикова С. В. Возможная ассоциация полиморфизма генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков с хромосомными нарушениями при хроническом лимфолейкозе // Вестник гематол. — 2013. — № 9 (2). — С. 40—41.
5. Росин В. А. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* у больных хроническим лимфолейкозом: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — СПб., 2010. — 22 с.
6. Bidwell J., Keen L., Gallagher G. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line database // Genes Immun. — 1999. — № 1 (1). — P. 3—19.
7. Binet J. L., Auquier A., Dighiero G. et al. A new Prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis // Cancer. — 1981. — № 48 (1). — P. 198—206.
8. Cerhan J. R., Wang S., Maurer M. J. et al. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival // Blood. — 2007. — № 109 (12). — P. 5439—5446.
9. Chen G.-B., Xu Y., Xu H.-M. et al. Practical and theoretical considerations in study design for detecting gene-gene interactions using MDR and GMDR approaches // PLoS ONE. — 2011. — № 6 (2). — P. e16981.

10. El-Omar E. M., Ng M. T., Hold G. L. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer // *Oncogene*. — 2008. — № 27 (2). — P. 244–252.

11. Forrest M. S., Skibola C. F., Lightfoot T. J. et al. Polymorphisms in innate immunity genes and risk of non-Hodgkin lymphoma // *Br. J. Haematol.* — 2006. — № 134 (2). — P. 180–183.

12. Kutikhin A. G. Association of polymorphism in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk // *Hum. Immunol.* — 2011. — № 72 (11). — P. 1095–116.

13. Lou X. Y., Chen G.-B., Yan L. et al. A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-environment interactions with application to nicotine dependence // *Am. J. Hum. Genet.* — 2007. — № 80 (6). — P. 1125–1137.

14. Morton L. M., Wang S. S., Cozen W. et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes // *Blood*. — 2008. — № 112 (13). — P. 5150–5160.

15. National Center for Biotechnology Information. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

16. National Human Genome Research Institute. URL: <https://www.genome.gov/>.

17. Purdue M. P., Lan Q., Wang S. S. et al. A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma // *Carcinogenesis*. — 2009. — № 30 (2). — P. 275–281.

18. Ritchie M. D., Hahn L. W., Roodi N. et al. Multifactor-Dimensionality Reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // *Am. J. Hum. Genet.* — 2001. — № 69 (1). — P. 138–147.

19. Vangsted A., Klausen T. W., Vogel U. Genetic mutations in multiple myeloma I: effect on risk of multiple myeloma // *Eur. J. Haematol.* — 2012. — № 88 (1). — P. 8–30.

РЕЗЮМЕ

Е. Л. Назарова, В. И. Шардаков, В. Т. Демьянова, И. А. Докшина, Е. Н. Зотина

Модификации генов иммунного ответа при различных типах течения хронического лимфолейкоза

Генетические факторы не только вносят вклад в развитие хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), но и могут оказывать влияние на характер течения патологического процесса. Обследовали 30 больных ХЛЛ с доброкачественным и прогрессирующим течением заболевания. У пациентов определяли распространенность генетических полиморфизмов в генах врожденного иммунного ответа. Протестировано 19 полиморфных локусов в 14 генах. Об-

наружено, что при доброкачественном течении ХЛЛ статистически значимо чаще встречались мутантные аллели генов фактора некроза опухоли (*TNF*) (G-308A), толл-подобного рецептора (toll-like receptor — *TLR*) *TLR9* (T-1237C) и *TLR2* (Arg753Gln) (OR: 4,70, $p=0,05$ и OR: 8,33, $p=0,03$ и OR: 5,50, $p=0,05$ соответственно). Напротив, сочетание нормальных гомозигот данных генов многократно увеличивало риск развития прогрессирующей формы заболевания. Можно связать наличие полиморфизма генов *TNF* в полиморфном локусе -308, *TLR2-753*, *TLR9-1237* с характером клинического течения ХЛЛ и рекомендовать использовать данные маркеры в качестве ранних дополнительных диагностических и прогностических критериев неблагоприятной формы лейкозного процесса с целью оптимизации химиотерапии.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, полиморфизм генов, иммунный ответ, цитокины, толл-подобные рецепторы.

SUMMARY

E. L. Nazarova, V. I. Shardakov, V. T. Dem'yanova, I. A. Dokshina, E. N. Zotina

Modification of immune response genes in various types of chronic lymphocytic leukemia

Genetic factors not only contribute to the development of chronic lymphocytic leukemia (CLL), but also can affect the nature of the pathological process. The study included 30 patients with CLL with indolent and progressive course of the disease. The patients were tested on prevalence of genetic polymorphisms in the genes of the innate immune response. Nineteen polymorphic loci in 14 genes were tested. It was found that with indolent course of CLL, mutant alleles of genes of tumor necrosis factor (*TNF*) (G-308A), Toll-like receptor (toll-like receptor — *TLR*) *TLR9* (T-1237C) and *TLR2* (Arg753Gln) (OR: 4.70, $p=0.05$ and OR: 8.33, $p=0.03$ and OR: 5.50, $p=0.05$, respectively) statistically, were encountered much more frequently. In contrast, combination of normal homozygotes of these genes greatly increased the risk of progressive form of the disease. Presence of *TNF* gene polymorphism in the polymorphic locus -308, *TLR2-753*, *TLR9-1237* can be associated with the nature of the clinical course of CLL to encourage use these markers as early additional diagnostic and prognostic criteria for unfavorable form of leukemic process in order to optimize chemotherapy.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, gene polymorphism, immune response, cytokines, Toll-like receptor.