

На правах рукописи

**Сиротина Светлана Сергеевна**

**АНАЛИЗ РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ  
В ФОРМИРОВАНИИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К  
ХРОНИЧЕСКОМУ ЛИМФОЛЕЙКОЗУ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Белгород – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" Минобрнауки РФ

**Научный руководитель:** **Чурносов Михаил Иванович**  
доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

**Батлукская Ирина Витальевна**

доктор биологических наук, доцент, ФГАОУ ВПО "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" Минобрнауки РФ, заведующая кафедрой биотехнологии и микробиологии

**Жукова Ольга Владимировна**

доктор биологических наук, профессор, ФГБУН «Институт общей генетики им. Вавилова Российской академии наук», заведующая лабораторией генетики человека

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздравсоцразвития РФ

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 года в «\_\_\_» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО "Белгородский государственный национальный исследовательский университет" по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО "Белгородский государственный национальный исследовательский университет"

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 212.015.13  
доктор биологических наук

В.И. Кочкаров

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Проблема лейкозов является одной из важных в современной медицине. В мире наблюдается непрерывный рост заболеваемости лейкозами [Hamblin T.J. et al., 2002; Никитин Е.А. и др., 2010]. При этом одной из наиболее распространенных форм лейкоза является хронический лимфолейкоз (ХЛЛ). Хронический лимфолейкоз — опухолевое заболевание лимфатической ткани, в основе развития которого лежит моноклоновая пролиферация патологических лимфоидных элементов [Морозова В.Т. и др., 2002, Воробьев А.И. и др., 2003, Никитин Е.А. и др., 2003]. Ежегодная заболеваемость ХЛЛ составляет 2,5-3 на 100 тыс. населения, а для лиц старше 60 лет – до 10 на 100 тысяч населения [Kini A. et al., 2000; Морозова В.Т. и др., 2002, Воробьев А.И. и др., 2003, Quiney C. et al., 2007]. Течение хронического лимфолейкоза характеризуется развитием различных осложнений: инфекционных (у 85% пациентов), цитопенических — анемия (15–30%) и тромбоцитопения (5–15%), снижающих продолжительность жизни больных [Доронин В.А. и др., 2003; Алексеева Ю.А. и др., 2008; Damle RN., et al., 2010].

Изучение факторов, определяющих формирование хронического лимфолейкоза, продолжает оставаться в центре внимания отечественных и зарубежных ученых [Caporaso N., et al., 2004; Eichhorst B. et al., 2008 Bianchi S. et al., 2010; Lee B.N. et al., 2011; Войцеховский В.В., 2007; Бидерман Б.В., 2008; Данилова Н.В. и др., 2009]. Как свидетельствуют результаты ряда исследований [Hjalmar V., 2002; Stevenson F.K., Caligaris-Cappio F., 2004; Клинков А.А. и др., 2004; Гра О.А. и др., 2008;], значимую роль в развитии ХЛЛ играют генетические факторы. Среди генов-кандидатов, регулирующих, преимущественно, процессы неспецифической защиты организма, гемопоэза, апоптоза, и опухолевой прогрессии, важное значение для хронического лимфолейкоза имеют гены интерлейкинов [Nüchel H., 2004; Tomić J. et al., 2006; Döhner H. et al., 2011; Антонеева И.И. и др., 2007]. Интерлейкины – полипотентные вещества белковой природы, обладающие множественными биологическими эффектами [Корякина Л.А., 2004]. Являясь начальным звеном активации иммунного ответа, они определяют эффективность и тип иммунного реагирования, принимают непосредственное участие в регуляции апоптотических и аутоиммунных процессов [Ana M. Peiro, 2008, Кетлинский С.А., 2008].

Клинико-генетические работы, посвящённые молекулярно-генетическим аспектам хронического лимфолейкоза в России немногочисленны и затрагивают преимущественно гены факторов некроза опухолей и детоксикации [Клинков А.А. и др., 2004; Бакиров Б.А., и др., 2005;2010; Гра О.А. и др., 2008; Овсепян В.А. и др., 2010, Тикунова Т.С., 2011]. Комплексные исследования роли полиморфных генетических маркеров интерлейкинов в отношении хронического лимфолейкоза в нашей стране до сих пор не проведены. Это диктует необходимость выполнения настоящего исследования.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (госконтракт № 14-740-11-0627)

**Цель исследования:**

Изучить генетические полиморфизмы интерлейкинов и оценить их патогенетическую значимость для хронического лимфолейкоза.

**Задачи исследования:**

1. Изучить ассоциации генетических вариантов интерлейкинов (VNTR IL-1Ra, -889C/T IL-1A, -511C/T IL-1B, -590C/T IL-4, -703C/T IL-5, -174 G/C IL-6, -251A/T IL-8, T113M IL-9, -592C/A IL-10) с формированием хронического лимфолейкоза.

2. Рассмотреть вклад сочетаний генов интерлейкинов в генетическую предрасположенность к хроническому лимфолейкозу.

3. Провести анализ ассоциаций полиморфизмов генов интерлейкинов с качественными патогенетически значимыми фенотипами ХЛЛ.

4. Определить связи генов-кандидатов с клинико-лабораторными показателями больных ХЛЛ.

5. Выявить влияние генетических полиморфизмов на общую выживаемость больных хроническим лимфолейкозом.

**Научная новизна.**

Впервые установлено важное патогенетическое значение генетических полиморфизмов интерлейкинов (-511C/T IL-1B, -889C/T IL-1, -590C/T IL-4, -703C/T IL-5, -174G/C IL-6, -251A/T IL-8, T113M IL-9, -592C/A IL-10, VNTR IL-1Ra) при хроническом лимфолейкозе среди населения Центрального Черноземья РФ.

Выявлены ассоциации полиморфных генетических маркеров с формированием хронического лимфолейкоза. Показан вклад сочетаний генов интерлейкинов в генетическую предрасположенность к хроническому лимфолейкозу. Установлены связи генетических вариантов интерлейкинов с патогенетически значимыми качественными и количественными признаками хронического лимфолейкоза. Выявлены генетические факторы, снижающие общую выживаемость больных ХЛЛ.

**Научно-практическое значение.**

Результаты работы вносят вклад в расшифровку генетических механизмов предрасположенности к хроническому лимфолейкозу, формирование представлений о молекулярно-генетических основах заболевания. Генотипирование больных ХЛЛ по генам интерлейкинов позволит формировать группы риска тяжелого течения болезни, с целью более эффективной реализации среди этих пациентов комплекса лечебно-профилактических мероприятий, направленных на предотвращение неблагоприятного исхода ХЛЛ. Результаты исследования используются в учебном процессе при преподавании медицинской генетики в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Генетические варианты интерлейкинов и их сочетания определяют предрасположенность к хроническому лимфолейкозу.
2. Полиморфизмы генов интерлейкинов проявляют плейотропное действие при формировании ХЛЛ.
3. Гены-кандидаты ассоциированы с патогенетически значимыми качественными и количественными признаками ХЛЛ.
4. Факторами, снижающими общую выживаемость больных хроническим лимфолейкозом, являются -590T IL-4, -174G IL-6 и наличие цитопенических осложнений в течении заболевания.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: X Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» «Инновационные технологии в биологии и медицине» (Москва, 2009), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний внутренних органов» (Белгород, 2009), IX Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых учёных по медицине (Тула, 2010), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы полиморбидной патологии в клинике внутренних болезней» (Белгород, 2010), IV Международной научной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2010), V Международной (XIV Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2010), третьей международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения – 2010» (Белгород, 2010), VI Съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), VI Международной Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2011), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (Курск, 2011), VII Международной Пироговской научной медицинской конференции (Москва, 2012), пятой международной научно-практической конференции «Геронтологические чтения – 2012» (Белгород, 2012).

**Личный вклад автора.** Автором лично определены цель и задачи исследования, разработаны методические подходы для их решения. Автор лично выполнил молекулярно-генетическое исследование, провел обработку, анализ и обобщение полученных результатов, подготовил основные публикации по выполненной работе, написал и оформил рукопись.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 в журналах из списка ВАК.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание использованных материалов и методов, результаты и их обсуждение, а также выводы и список литературы. Материалы диссертации изложены на 155 страницах машинописного текста и содержат 12 таблиц и 45 рисунков.

Библиографический указатель содержит 233 наименований, из которых 148 иностранных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы исследования.** Анализ молекулярно-генетических маркеров проводили на материале двух выборок: 206 больных хроническим лимфолейкозом и 307 человек популяционного контроля. Общий объем исследуемой выборки составил 513 человек. В выборки больных и популяционного контроля включались индивидуумы русской национальности, являющиеся уроженцами Центрального Черноземья России и не имеющие родства между собой. Пациенты включались в соответствующую группу больных только после установления диагноза заболевания, подтвержденного с помощью клинических и лабораторно-инструментальных методов обследования [Воробьев А.И. и др., 2002]. Клинико-лабораторное обследование больных проводилось сотрудниками отделения гематологии Белгородской областной клинической больницы (заведующая отделением – Тикунова Т.С.). Среди 206 больных ХЛЛ мужчин было 114 человек (55,33%), женщин – 92 (44,67%). В популяционной выборке (n=307) распределение по полу было аналогичным: мужчины – 162 человек (51,95%), женщины – 145 (48,05%) (p>0,05). Средний возраст больных составил 65,46±9,69 лет (варьировал от 34 до 88 лет), популяционной выборки – 62,20±6,28 лет (варьировал от 28 до 79 лет) (p>0,05). Таким образом, группа популяционного контроля не отличалась от группы больных как по полу, так и по возрасту.

Всем больным с хроническим лимфолейкозом и индивидуумам популяционного контроля проводилось типирование девяти молекулярно-генетических маркеров интерлейкинов: интерлейкина 1В (-511С/Т IL-1В), интерлейкина 1А (-889С/Т IL-1), интерлейкина 4 (-590С/Т IL-4), интерлейкина 5 (С-703Т IL-5), интерлейкина 6 (-174G/С IL-6), интерлейкина 8 (-251А/Т IL-8), интерлейкина 9 (Т113М IL-9), интерлейкина 10 (-592С/А IL-10) и антагониста рецептора интерлейкина 1 (VNTR IL-1Ra). Выбор данных систем для исследования обусловлен их важным патогенетическим значением для ХЛЛ [Bianchi S., 2010; Döhner H. et al., 2011; Антонеева И.И. и др., 2007].

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (рН=8.0).

**Методы исследования.** *Молекулярно-генетические методы.*

Выделение геномной ДНК из периферической крови проведено методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew, 1984].

Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК. ПЦР проводилась на амплификаторах «Терцик-МС4» (ДНК-технология) и IQ5 (Bio-Rad) с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* производства фирмы «Силекс-М», олигонуклеотидных

праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Синтол». Генотипирование ДНК-маркеров производилось следующими методами: анализ полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов (VNTR IL-1Ra); анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (-511C/T IL-1B, -889C/T IL-1, -703C/T IL-5, T113M IL-9, -592C/A IL-10) продуктов ПЦР-амплификации специфических участков генома с использованием соответствующих ферментов рестрикции производства ООО «Сибэнзим» (Новосибирск). Визуализация фореграмм осуществлялась в темном боксе с трансиллюминатором фирмы UVP (Швеция); анализ дискриминации аллелей методом TagMan зондов (-590C/T IL-4, -174G/C IL-6, -251A/T IL-8) на амплификаторе IQ5 с детектирующей системой в режиме реального времени. Для дискриминации аллелей использовалась программа «Bio-Rad IQ5-Standard Edition».

*Статистические методы.* Формирование базы данных и статистические расчеты осуществлялись с использованием программы «STATISTICA 6.0». Определение фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [Животовский Л.А., 1983]. Для оценки соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому, исходя из равновесия Харди-Вайнберга, использован критерий  $\chi^2$  [Вейр Б., 1995].

Ассоциации аллелей и генотипов изученных ДНК-маркеров с предрасположенностью к хроническому лимфолейкозу, а также с качественными признаками, характеризующими его клинические особенности, 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 [Schlesselman J., 1982].

При изучении ассоциации генетических полиморфизмов с патогенетически значимыми количественными признаками ХЛЛ вначале оценивали характер распределения этих признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка [Реброва О.Ю., 2006]. Получено, что распределение всех исследуемых количественных признаков (уровень лактатдегидрогеназы, содержание тромбоцитов, лимфоцитов, содержание зрелых лимфоцитов в миелограмме при манифестации ХЛЛ и его течении) не соответствовало закону нормального распределения и поэтому для их описания применяли медиану (Me) и интерквартильный размах (Q25-Q75), а для сравнительного анализа – критерий Манна-Уитни [Реброва О.Ю., 2006]. Исследование ассоциаций общей выживаемости пациентов с полиморфными генетическими маркерами проведено методом множительных оценок Каплан-Майера. Влияние генетических полиморфизмов на общую выживаемость больных ХЛЛ изучали с применением регрессионной модели Кокса. Анализ ассоциаций сочетаний генетических вариантов с ХЛЛ проведен с помощью программного обеспечения APSampler (<http://sources.redhat.com/cygwin/>), использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику [Favorov A. V., et al., 2005]. При проведении множественных сравнений с целью

минимизации ошибок первого рода, связанных с получением ложноположительных результатов использовали поправку Бонферрони [Реброва О.Ю., 2006].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Изучение ассоциаций генетических полиморфизмов интерлейкинов с формированием и патогенетически значимыми качественными признаками хронического лимфолейкоза

Проведенный сравнительный анализ распределения молекулярно-генетических маркеров интерлейкинов среди больных ХЛЛ и в популяционном контроле показал различия между ними по генетическому полиморфизму -590С/Т IL-4 (Рис.1). Установлена более высокая частота аллеля -590Т IL-4 (24,51%) среди больных ХЛЛ по сравнению с контрольной группой (18,24%, OR=1,45, 95%CI 1,06-1,99;  $\chi^2=5,52$ ,  $p=0,01$ ). Таким образом, генетический вариант -590Т IL-4 является фактором риска развития хронического лимфолейкоза. Литературные материалы свидетельствуют, что полиморфизм, связанный с заменой цитозина на тимин в позиции 590 локуса IL-4, обуславливает снижение экспрессии гена, что может приводить к уменьшению образования интерлейкина 4 [Дубаков А. В. и др., 2004; Шевченко А. В. и др., 2009; Чайковский А.В., и др., 2009]. При этом могут снижаться противоопухолевый и противовоспалительный эффекты интерлейкина 4 у индивидуумов с генетическим вариантом -590Т IL-4, что, как свидетельствуют результаты нашего исследования, имеет важное этиопатогенетическое значение при ХЛЛ.

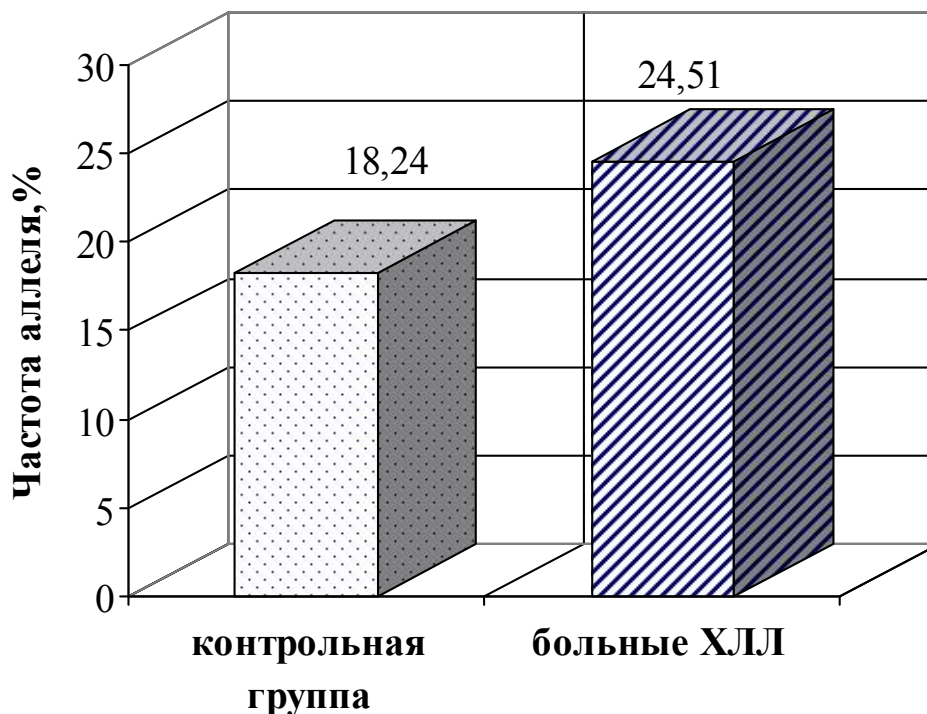


Рис.1. Распределение аллеля -590Т IL-4 среди больных ХЛЛ и в популяционном контроле



Исследование особенностей генетической "конституции" больных хроническим лимфолейкозом с различными стадиями заболевания выявило следующее. Во-первых, среди пациентов с 0-I стадиями заболевания выявлена максимальная концентрация молекулярно-генетических маркеров -590Т IL-4 (35,37%) и -590ТТ IL-4 (15,13%), что статистически достоверно превышает показатели контрольной группы (18,24%,  $\chi^2=22,22$ ,  $p=0,001$ , OR=2,46, 95%CI 1,66-3,64 и 2,61%,  $\chi^2=18,38$ ,  $p=0,001$ , с учетом поправки Бонферрони  $p_{\text{cor}}=0,003$ , OR=6,65, 95%CI 2,46-18,64, соответственно).

Во-вторых, отличительными особенностями генетических характеристик пациентов со II стадией заболевания является наибольшая концентрация аллелей -889Т IL-1А (30,92%) и -703Т IL-5 (35,33%) в сравнении с контрольной группой (22,77%;  $\chi^2=3,94$ ,  $p=0,04$ , OR=1,51, 95%CI 1,00-2,28; 26,41%,  $\chi^2=4,29$ ,  $p=0,03$ , OR=1,52, 95%CI 1,02-2,26, соответственно). Частота генотипа -590ТТ IL-4 среди пациентов со II стадией заболевания равна 12,98%, что в 5 раз превышает аналогичный показатель контрольной группы (2,61%  $\chi^2=12,61$ ,  $p=0,001$ ,  $p_{\text{cor}}=0,003$ , OR=5,57 95%CI 1,94-16,21).

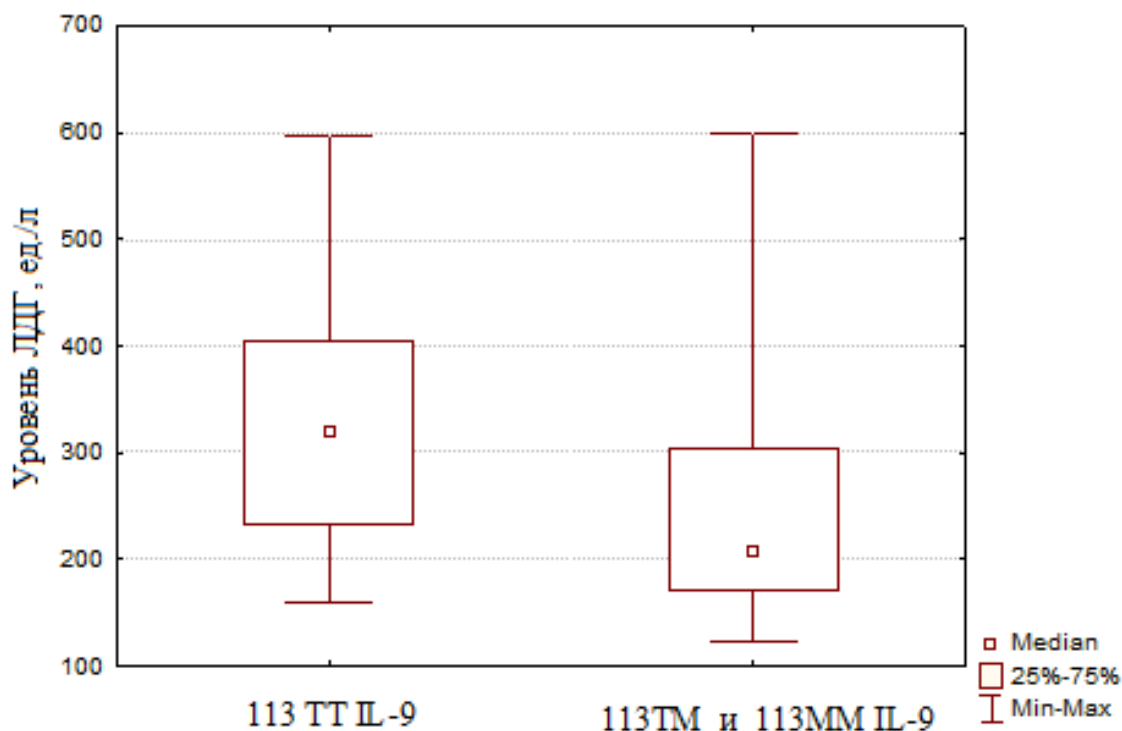
В-третьих, выявлены различия в распространённости аллеля -703Т IL-5 между больными с III-IV стадиями ХЛЛ и контрольной группой: среди больных концентрация данного маркера (41,18%) была более чем в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе (26,41%,  $\chi^2=5,90$ ,  $p=0,01$ , OR=1,95, 95%CI 1,12-3,36). Поскольку этот полиморфизм расположен в промоторной области гена [Сазонов А.Э. и др, 2005], аллель -703Т IL-5, не влияя на структуру белка, может существенно изменять уровень экспрессии гена интерлейкина 5 [Чайковский А.В., и др., 2009] и таким образом влиять на течение хронического лимфолейкоза [Никитин Е.А. и др., 2008].

Изучение частот аллелей и генотипов генов интерлейкинов среди пациентов с различными цитопеническими осложнениями на момент обследования (тромбоцитопения и анемия) показало, что пациенты с развившейся тромбоцитопенией на момент обследования отличаются максимальной концентрацией аллелей IL-1Ra\*1 (84,62%), -889Т IL-1А (36,54%) и генотипа -889ТТ IL-1А (19,24%) по сравнению с контролем (70,31%,  $\chi^2=4,11$ ,  $p=0,04$ , OR=2,32, 95%CI 1,02-5,46; 22,77%,  $\chi^2=4,26$ ,  $p=0,03$ , OR=1,95, 95%CI 1,03-3,67; и 3,63%,  $\chi^2=9,44$ ,  $p=0,003$ ,  $p_{\text{cor}}=0,009$  OR=6,32, 95%CI 1,72-22,28, соответственно).

## **2. Молекулярно-генетические маркеры и клинико-лабораторные показатели больных ХЛЛ**

На следующем этапе работы нами были рассмотрены связи генетических полиморфизмов интерлейкинов с количественными патогенетически значимыми признаками ХЛЛ, характеризующими клинико-лабораторный статус больных (уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), уровень тромбоцитов, лимфоцитов, содержание зрелых лимфоцитов в миелограмме).

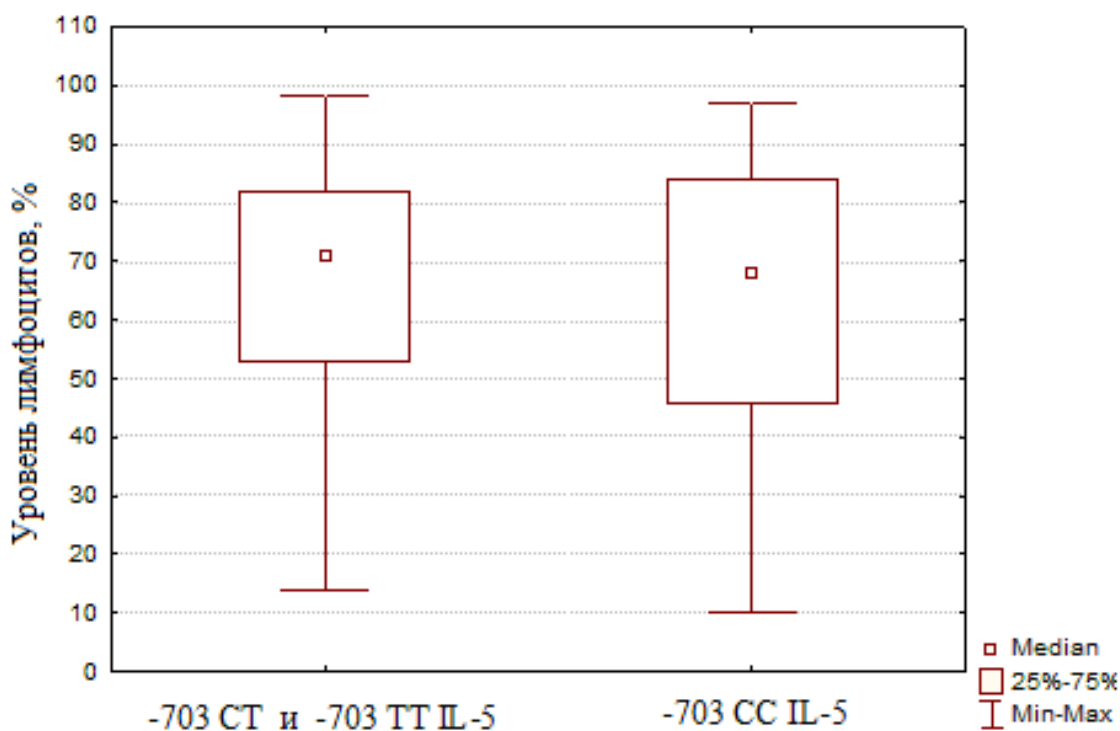
Установлено, что в дебюте заболевания генетический маркер T113M IL-9 связан с уровнем ЛДГ у больных ХЛЛ. Индивидуумы с генотипом 113ТТ IL-9 имеют более высокое содержание ЛДГ (медиана – 320,00 ед./л, нижний квартиль – 234,00 ед./л, верхний квартиль – 405,00 ед./л) по сравнению с пациентами с генотипами 113ТМ и 113ММ IL-9 (медиана – 201,50 ед./л, интерквартильный размах – 167,00-303,00 ед./л,  $p=0,007$ ) (Рис.2). В литературе имеются данные о том, что аллель 113Т IL-9 связан с усилением экспрессии интерлейкина 9 [Vink A., et al., 1999], обладающего провоспалительным эффектом [Fischer M., et al., 2003; Калимуллина Д.Х. и др., 2004], что может обуславливать неблагоприятное течение ХЛЛ, одним из маркеров которого является повышенный уровень ЛДГ [Воробьев А. И., 2003].



**Рис. 2. Ассоциации генетического полиморфизма T113M IL-9 с уровнем лактатдегидрогеназы у больных ХЛЛ в дебюте заболевания**

Полиморфный генетический маркер -703С/Т IL-5 ассоциирован с уровнем тромбоцитов и ЛДГ в дебюте ХЛЛ. У пациентов с генотипами -703 СТ и -703ТТ IL-5 содержание тромбоцитов (медиана  $200,00 \times 10^9$ /л, интерквартильный размах  $154,00 \times 10^9$ /л -  $242,00 \times 10^9$ /л) меньше, а уровень лактатдегидрогеназы (медиана – 226,50 ед./л, нижний квартиль – 178,50 ед./л, верхний квартиль – 322,50 ед./л) выше по сравнению с пациентами с генотипом -703СС IL-5 (медиана  $217,50 \times 10^9$ /л, нижний квартиль  $178,00 \times 10^9$ /л, верхний квартиль  $270,00 \times 10^9$ /л,  $p=0,04$  и медиана – 213,50 ед./л, интерквартильный размах – 163,90-361,50 ед./л,  $p=0,03$ , соответственно). Также установлено, что индивидуумы с генотипами -703СТ и -703ТТ IL-5 имеют более выраженный лимфоцитоз (медиана – 71,00%, нижний квартиль

– 53,00%, верхний квартиль – 82,00%) по сравнению с пациентами с генотипом -703СС IL-5 (медиана – 68,00%, интерквартильный размах – 46,00–84,00%,  $p=0,002$ ) (Рис. 3).



**Рис. 3. Ассоциации генетических вариантов локуса -703С/Т IL-5 с уровнем лимфоцитов у больных ХЛЛ на момент обследования**

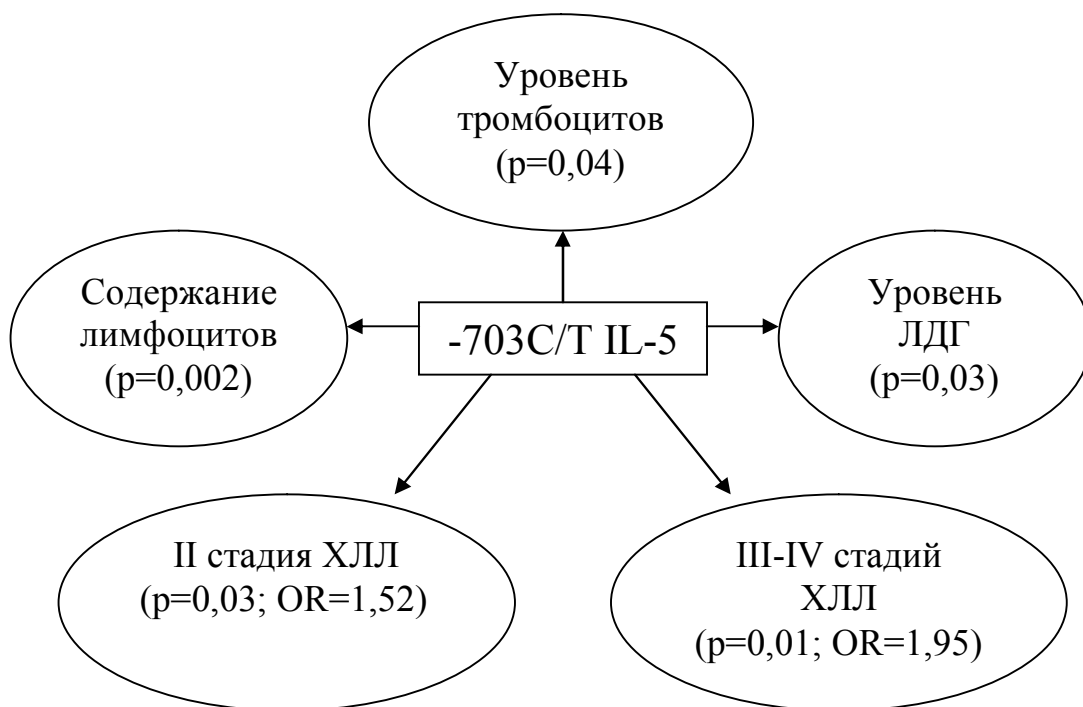
Уровень лимфоцитов, %

Анализ вовлеченности генетических вариантов локуса -251А/Т IL-8 в формирование клиничко-лабораторных показателей больных ХЛЛ показал, что у пациентов с генотипами -251 АТ и -251ТТ IL-8 содержание тромбоцитов (медиана –  $171 \times 10^9/\text{л}$ , интерквартильный размах –  $125,00 \times 10^9/\text{л}$  -  $217,00 \times 10^9/\text{л}$ ) ниже чем у индивидуумов с генетическим вариантом -251АА IL-8 (медиана –  $186 \times 10^9/\text{л}$ , интерквартильный размах –  $154 \times 10^9/\text{л}$  -  $230 \times 10^9/\text{л}$ ) ( $p=0,02$ ). Молекулярно-генетический маркер -592С/А IL-10 ассоциирован с уровнем тромбоцитов и зрелых лимфоцитов в миелограмме у больных ХЛЛ. Индивидуумы с генотипом -592СС IL-10 отличаются более низким уровнем тромбоцитов (медиана –  $182,00 \times 10^9/\text{л}$ , нижний квартиль –  $142,00 \times 10^9/\text{л}$ , верхний квартиль –  $240,00 \times 10^9/\text{л}$ ) и более высоким содержанием зрелых лимфоцитов в миелограмме (медиана – 40,00%, нижний квартиль – 21,00%, верхний квартиль – 70,00%) по сравнению с больными, имеющими генетические варианты -592АС и -592АА IL-10 (медиана  $185,50 \times 10^9/\text{л}$ , интерквартильный размах  $151,50 \times 10^9/\text{л}$  -  $221,50 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p=0,02$  и медиана 21,00 %, интерквартильный размах 11,00-52,00 %,  $p=0,03$ ).

Согласно данным литературы [Fellowes R. et al., 2000; Коненков В. И. и др., 2006; Шевченко А. В. и др., 2009] аллель -592С IL-10 связан со снижением экспрессии интерлейкина 10. Поэтому повышенный уровень

зрелых лимфоцитов в миелограмме и снижение уровня тромбоцитов у пациентов с генотипом -592СС IL-10, выявленные в нашем исследовании, могут быть обусловлены снижением выработки интерлейкина 10 и соответственно уменьшением его противовоспалительного и противоопухолевого эффектов [Eskdale J. et al., 1998; Guzowski D. et al., 2005; Кадагидзе З.Г., 2003].

Полученные в работе данные свидетельствуют о плеiotропном действии молекулярно-генетических маркеров -590С/Т IL-4, -703С/Т IL-5 и -592С/А IL-10 при формировании патогенетически значимых качественных и количественных признаков ХЛЛ. Так, генетический полиморфизм -703С/Т IL-5 ассоциирован с формированием II (OR=1,52, p=0,03) и III-IV стадий ХЛЛ (OR=1,95, p=0,01), а также с уровнем тромбоцитов (p=0,04) и ЛДГ (p=0,03) в дебюте хронического лимфолейкоза и содержанием лимфоцитов в течении заболевания (p=0,002) (Рис.4).



**Рис. 4. Ассоциации генетического полиморфизма -703С/Т IL-5 с качественными и количественными патогенетически значимыми признаками ХЛЛ**

Генетические варианты -590С/Т IL-4 являются фактором риска формирования хронического лимфолейкоза (OR=1,45, p=0,02), 0-I (OR=2,46, p=0,001) и II стадий заболевания (OR=5,57, p=0,001), развития токсических симптомов в течении заболевания (OR=1,65, p=0,02). Полиморфизм -592С/А IL-10 связан с развитием цитопенических осложнений в течении ХЛЛ (OR=11,89, p=0,00003), а также ассоциирован с уровнем тромбоцитов (p=0,03) и зрелых лимфоцитов в миелограмме (p=0,02) у больных ХЛЛ.

### **3. Анализ роли сочетаний генов интерлейкинов в формировании предрасположенности к хроническому лимфолейкозу**

С использованием биоинформатических подходов установлена значимая роль генетических вариантов интерлейкинов -889С/Т IL-1А, -590С/Т IL-4, -703С/Т IL-5, -251А/Т IL-8 в формировании таких патогенетически значимых признаков хронического лимфолейкоза как стадии заболевания по классификации К. Rai.

Получено, что сочетание генотипа -590ТТ IL-4 с аллелем -703С IL-5 ассоциировано с формированием с 0-I стадий хронического лимфолейкоза. У 15,11% больных ХЛЛ с 0-I стадиями заболевания имеется данное сочетание генетических маркеров, тогда как в контрольной группе оно выявлено лишь у 2,62% (OR=6,70, 95%, CI 2,67-16,79,  $p=0,00004$ ,  $p_{\text{cor}}=0,03$ ). Сочетание двух генетических вариантов -889С IL-1А и -590С IL-4, которое наблюдается у 75,58% больных и у 91,47% популяционного контроля, является протективным фактором развития 0-I стадий хронического лимфолейкоза ( $p=0,00005$ ,  $p_{\text{cor}}=0,03$ , OR=0,23, 95% CI 0,11-0,46).

Выявлены различия в концентрациях сочетаний генотипа -703СТ IL-5 с аллелем -251А IL-8 между группой больных ХЛЛ со II стадией заболевания и популяционным контролем. Это сочетание встречается в 1,81 раза чаще среди больных ХЛЛ (48,05%), чем в популяционном контроле (26,55%,  $p=0,00008$ ,  $p_{\text{cor}}=0,05$ , OR=2,85, 95% CI 1,68-4,84).

Как свидетельствуют результаты ряда исследований [Johansson U. et al., 2005; Lu W. et al., 2005; Gonzalez D. et al., 2011; и др.] интерлейкин 1 А, интерлейкин 5, интерлейкин 4 и интерлейкин 8 оказывают действие на опухолевую пролиферацию, индукцию апоптоза и аутоиммунные процессы, что может иметь важное значение в развитии хронического лимфолейкоза и осложнений заболевания.

### **4. Гены-кандидаты и выживаемость пациентов с ХЛЛ**

С помощью монофакторного анализа общей выживаемости пациентов с ХЛЛ (регрессионная модель Кокса) были выделены факторы, имеющие неблагоприятное прогностическое значение. Установлено, что наличие аллелей -590Т IL-4 ( $p=0,05$ ), -174G IL-6 ( $p=0,05$ ) и развитие цитопенических осложнений в течении ХЛЛ ( $p=0,04$ ) ухудшают общую выживаемость больных хроническим лимфолейкозом. Предполагая, что возможна взаимосвязь факторов, влияющих на общую выживаемость пациентов с ХЛЛ, был проведен многофакторный регрессионный анализ, который показал аналогичные данным монофакторного анализа результаты: неблагоприятными прогностическими факторами являются носительство аллелей -590Т IL-4 и -174G IL-6, наличие цитопенических осложнений в течении ХЛЛ ( $p=0,05$ ). Механизм данных ассоциаций может быть связан со снижением противоопухолевой защиты и уменьшением противовоспалительных эффектов при генетических вариантах -590Т IL-4 и -174G IL-6 [Bushley A. W. et al., 2004; Шевченко А. В. И др., 2009], что в

конечном итоге может снижать общую выживаемость больных ХЛЛ [Hulkkonen J., et al., 2002; Кадагидзе З.Г., 2003].

## ВЫВОДЫ

1. Генетические варианты интерлейкинов (VNTR IL-1Ra, -889C/T IL-1A, -511C/T IL-1B, -590C/T IL-4, -703C/T IL-5, -174G/C IL-6, -251A/T IL-8, T113M IL-9, -592C/A IL-10) определяют подверженность к хроническому лимфолейкозу, ассоциированы с особенностями проявления и характером прогрессирования заболевания.

2. Частота аллеля -590T IL-4 среди больных хроническим лимфолейкозом (24,51%) в 1,3 раза выше, чем в популяционном контроле (18,24%). Сочетания генетических вариантов -590TT IL-4 с -703C IL-5 (OR=6,70) и -889T IL-1A с -590C IL-4 (OR=0,23) маркируют 0-I стадии заболевания, а комбинация -703CT IL-5 с -251A IL-8 связана с формированием II стадии ХЛЛ (OR=2,85).

3. Повышенный уровень лактатдегидрогеназы у больных ХЛЛ ассоциирован с генотипами -703CT, -703TT IL-5 и -113TT IL-9, высокое содержание зрелых лимфоцитов в миелограмме связано с -592CC IL-10 и -703CT, -703TT IL-5, а уровень тромбоцитов маркируется генетическими полиморфизмами VNTR IL-1Ra, -889C/T IL-1A, -703C/T IL-5, -251A/T IL-8 и -592C/A IL-10

4. Молекулярно-генетические маркеры -590C/T IL-4, -703C/T IL-5 и -592C/A IL-10 оказывают плеiotропное действие на формирование патогенетически значимых качественных и количественных признаков хронического лимфолейкоза.

5. Носительство аллелей -590T IL-4 и -174G IL-6, наличие цитопенических осложнений в течении заболевания являются неблагоприятными прогностическими факторами, снижающими общую выживаемость больных хроническим лимфолейкозом.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Сиротина, С. С.** О различиях в частотах аллелей VNTR полиморфизма IL-1Ra среди больных хроническим лимфолейкозом и популяционным контролем / С. С. Сиротина, Т. С. Тикунова // Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний внутренних органов : материалы межрегион. науч.-практ. конф., Белгород, 17 дек. 2009 г. / БелГУ, Упр. здравоохранения адм. г. Белгорода, Муницип. учреждение здравоохранения гор. больница № 2 ; под ред. О. А. Ефремовой. – Белгород, 2009. – С. 53.

2. **Сиротина С. С.** Генетический полиморфизм интерлейкинов и хронический лимфолейкоз / С. С. Сиротина // Здоровье и образование в XXI веке. Инновационные технологии в биологии и медицине : материалы X

междунар. конгр., Москва, 1-5 дек. 2009 г. / Рос. ун-т дружбы народов [и др.]. – М., 2009. – С. 945-946.

3. Молекулярно-генетические маркеры цитокинов: популяционная распространенность и связь с мультифакториальной патологией / Е. В. Калмыкова, Т. С. Тикунова, ... **С. С. Сиротина** [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Сер. Медицина. – 2009. – № 4. – С. 617-618.

4. К вопросу об ассоциации полиморфизма T113M IL-9 с хроническим лимфолейкозом / Н. А. Рудых, **С. С. Сиротина**, О. А. Ефремова [и др.] // Медицинская генетика. – 2010. – Спец. вып. – С. 154. – (Материалы VI съезда Рос. о-ва мед. генетиков, Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г.).

5. **Сиротина, С. С.** Изучение роли полиморфного маркера -590 С/Т IL-4 в формировании хронического лимфолейкоза / С. С. Сиротина, М. И. Чурносов // Геронтологические чтения – 2010 : материалы III междунар. науч.-практ. конф., Белгород, 11-12 нояб. 2010 г. / БелГУ, Геронтол. о-во РАН, Белгор. отд-ние. – Белгород, 2010. – С. 15-16. – (Геронтологический журнал им. В. Ф. Купревича. – 2010. – № 2).

6. **Сиротина, С. С.** Результаты генотипирования IL-6 у больных хроническим лимфолейкозом / С. С. Сиротина // Актуальные вопросы полиморбидной патологии в клинике внутренних болезней : материалы междунар. науч.-практ. конф., Белгород, 20 мая 2010 г. / БелГУ, Деп. здравоохранения и соц. защиты населения по Белгор. обл. ; под ред. О. А. Ефремовой. – Белгород, 2010. – С. 73-75.

7. **Сиротина, С. С.** Молекулярно-генетическое исследование хронического лимфолейкоза / С. С. Сиротина // Материалы IV международной научной конференции молодых ученых-медиков, Курск, 25-26 февр. 2010 г. : в 3 т. / Курск. гос. мед. ун-т ; под ред. В. А. Лазаренко. – Курск, 2010. – Т. 3. – С. 182-184.

8. **Сиротина, С. С.** Результаты генотипирования IL-1A у больных хроническим лимфолейкозом / С. С. Сиротина // IX Всероссийская университетская научно-практическая конференция молодых ученых по медицине : сб. материалов / Тул. гос. ун-т [и др.]. – Тула, 2010. – С. 112-113. – (Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. 17, № 2, прил.).

9. Результаты генотипирования фактора некроза опухоли альфа и интерлейкина-1A у больных хроническим лимфолейкозом / Т. С. Тикунова, **С. С. Сиротина** // Вестник РГМУ. – 2010. – № 2. – С. 561.

10. **Сиротина, С. С.** Роль генетического фактора -251 А/Т IL-8 в формировании хронического лимфолейкоза / С. С. Сиротина // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии : материалы II всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Курск, 17-19 мая 2011 г. : сб. материалов / РАЕН, Центр.-Чернозем. центр РАМН, КГМУ [и др.] ; отв. ред. В. П. Иванов. – Курск, 2011. – С. 100-101.

11. **Сиротина, С. С.** Исследование гена-кандидата IL-5 хронического лимфолейкоза / С. С. Сиротина // Вестник РГМУ. – 2011. – С. 285-286.

12. Исследование клинического значения полиморфизма гена интерлейкина IL-10 (-592C/A IL-10) в дебюте хронического лимфолейкоза / **С. С. Сиротина**, Т.С. Тикунова, К.И. Прощаев // Вестник РГМУ. – 2012. –С. 157-158.

13. **Сиротина С.С.** Изучение ассоциаций полиморфных маркеров генов интерлейкинов с патогенетически значимыми качественными признаками хронического лимфолейкоза / С.С. Сиротина // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2012. –Выпуск 17, №4 (123), С. 177-182.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:**

IL	- интерлейкин
VNTR	- переменное число tandemных повторов
ХЛЛ	- хронический лимфолейкоз
ЛДГ	- лактатдегидрогеназа