

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ FCR У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ НА ОСНОВАНИИ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ

Назарова Е.Л., Сухорукова Э.Е., Минаева Н.В., Шардаков В.И., Фокина Е.С.

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

**Резюме.** В многочисленных исследованиях показано, что распространенные варианты генов иммунного/воспалительного ответа могут оказывать влияние на эффективность лечения хронического лимфолейкоза (CLL). В ранее опубликованной работе мы представили данные, что полиморфные варианты ряда генов иммунного ответа у больных CLL ассоциированы с различной скоростью прогрессирования заболевания. Установлены корреляционные связи распределения модификационных профилей генов при доброкачественной и прогрессирующей формах CLL. В данном исследовании отражены результаты фармакогенетических изысканий, направленных на выявление ассоциаций между полиморфизмом генов иммунного ответа и эффективностью лечения FCR больных CLL. Исследовались 19 полиморфных участков 14 генов иммунного ответа у 33 пациентов с CLL, получавших терапию FCR. Генотипы *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9*, *IL-1 $\beta$* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *CD14*, *TNF $\alpha$* , *FCGR2A* определяли методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами. Больные CLL были разделены на несколько групп в зависимости от сроков ответа на лечение FCR: с частичной/полной ремиссией заболевания после двух, четырех, шести курсов лечения и с отсутствием ответа на терапию. Выявленные статистически значимые различия в распределении частот гаплотипов затрагивали гены *IL-1 $\beta$*  (C-3953T) ( $p = 0,02-0,009$ ), *IL-10* (C-819T) ( $p = 0,04$ ), *IL-10* (G-1082A) ( $p = 0,04-0,002-0,006$ ), *FCGR2A* (His166Arg) ( $p = 0,006$ ), *TLR4* (Thr399Ile) ( $p = 0,02$ ), *TLR6* (Ser249Pro) ( $p = 0,04$ ), *TLR9* (A2848G) ( $p = 0,04-0,007$ ), *CD14* (C-159T) ( $p = 0,03$ ). При проверке гипотезы достоверности результатов множественных сравнений была подтверждена значимость обнаруженных событий только для гена *IL-10* (G-1082A) ( $p < 0,01$ ;  $\chi^2 = 20,082$ ). Полученные результаты показывают взаимосвязь между мутационным статусом гена *IL-10*-1082 и сроками ответа на терапию FCR, а также позволяют выделить группу больных с первично-резистентными к FCR формами CLL до начала лечения. Обсуждается роль взаимоотношений между полиморфизмом гена *IL-10* и продукцией IL-10 с вероятностью возникновения и характером течения В-зрелоклеточных опухолей лимфатической системы. Доказанным считается, что IL-10 является фактором роста для неизмененных и трансформированных В-лимфоцитов человека, контролирует баланс между клеточным и гуморальным иммунными ответами, обладает выраженной иммуносупрессивной активностью, наряду со способностью стимулировать пролиферацию опухолевых клеток. Приводятся обоснования прове-

### Адрес для переписки:

Назарова Елена Львовна  
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»  
610027, Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 72.  
Тел./факс: 8 (8332) 54-97-31.  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

### Address for correspondence:

Nazarova Elena L.  
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency  
610027, Russian Federation, Kirov, Krasnoarmeiskaya str., 72.  
Phone/Fax: 7 (8332) 54-97-31.  
E-mail: nazarova@niigpk.ru

### Образец цитирования:

Е.Л. Назарова, Э.Е. Сухорукова, Н.В. Минаева, В.И. Шардаков, Е.С. Фокина «Оценка эффективности терапии FCR у больных хроническим лимфолейкозом на основании иммуногенетических критериев» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 523-534. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-523-534

© Назарова Е.Л. и соавт., 2018

### For citation:

E.L. Nazarova, E.E. Sukhorukova, N.V. Minaeva, V.I. Shardakov, E.S. Fokina "Evaluation of FCR therapy efficacy in patients with chronic lymphocytic leukemia based on immunogenetic criteria", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 523-534. doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-523-534

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-523-534

дения фармакогеномных исследований при CLL для прогнозирования эффективности конкретного препарата или комбинации лекарственных средств у каждого пациента, что в перспективе позволит обнаружить фактор, влияющий на успех терапии уже на ранних ее этапах.

*Ключевые слова:* хронический лимфолейкоз, ритуксимаб, полиморфизм генов, иммунный ответ, интерлейкин-10, эффективность лечения

## EVALUATION OF FCR THERAPY EFFICACY IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA BASED ON IMMUNOGENETIC CRITERIA

Nazarova E.L., Sukhorukova E.E., Minaeva N.V., Shardakov V.I., Fokina E.S.

*Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation*

**Abstract.** A number of studies have shown that distinct common variants of the genes controlling immune/inflammatory response may affect efficiency of chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment. In a recently published paper, we reported polymorphic variants of some immune response genes in CLL patients to be associated with different rates of disease progression. Correlations between the distribution of gene modification profiles in indolent and aggressive forms of CLL have been established. The present study describes results of pharmacogenetic studies aimed for identifying associations between the immune response genes polymorphism, and efficacy of FCR treatment regimen in CLL patients. 19 polymorphic loci of 14 immune response genes were studied in 33 patients with CLL who received FCR therapy. The *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR9*, *IL-1 $\beta$* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *CD14*, *TNF $\alpha$* , *FCGR2A* genotypes were determined by polymerase chain reaction with allele-specific primers. CLL patients were divided into several groups depending on the terms of response to FCR treatment, i.e., achieving partial/complete remission after two, four, six courses of treatment, and those who did not respond to the therapy. Statistically significant differences in the distribution of haplotype frequencies were detected for the following genes: *IL-1 $\beta$*  (C-3953T,  $p = 0.02-0.009$ ); *IL-10* (C-819T,  $p = 0.04$ ); *IL-10* (G-1082A,  $p = 0.04-0.002-0.006$ ), *FCGR2A* (His166Arg,  $p = 0.006$ ); *TLR4* (Thr399Ile,  $p = 0.02$ ); *TLR6* (Ser249Pro,  $p = 0.04$ ); *TLR9* (A2848G,  $p = 0.04-0.007$ ); *CD14* (C-159T,  $p = 0.03$ ). When testing the significance hypothesis by multiple comparisons, the difference for the detected events was confirmed only for *IL-10* gene (G-1082A,  $p < 0.01$ ;  $\chi^2 = 20,082$ ). The results show a relationship between the allelic status of the *IL-10-1082* gene and the timing of response to FCR therapy, as well as predict a group of patients with primary-resistant CLL before treatment. The role of the relationship between *IL-10* gene polymorphism and IL-10 production is discussed in connection with occurrence risk and clinical course of mature B-cell lymphoid malignancies. IL-10 is thought to be a growth factor for normal and transformed human B-lymphocytes, it controls a balance between cellular and humoral immune responses while exerting a pronounced immunosuppressive activity, along with ability to stimulate tumor cell proliferation. A rationale for conducting pharmacogenomic studies in CLL is provided, in order to predict efficiency of a specific drug or their combination in a distinct patient, thus representing chances to detect a factor which may influence success of the therapy since its earlier stage.

*Keywords:* chronic lymphocytic leukemia, rituximab, gene polymorphism, immune response, interleukin-10, treatment efficacy

### Введение

Несмотря на значительные успехи в лечении хронического лимфолейкоза (CLL — chronic lymphocytic leukemia), медиана выживаемости при современной терапии весьма гетерогенна и колеблется от 79 до 119 месяцев. Изменчивость характера течения CLL и результатов лечения во многом обусловлены биологическими свойствами опухоли, а также участием в патогенезе заболевания генетических и иммунологических факто-

ров [39]. В начале 1980-х годов использовались две простые клинические системы стадирования, предложенные К.Р. Rai и соавт. [34] и J.L. Binet и соавт. [8], которые впоследствии применялись для оценки прогноза CLL. Дополнительно идентифицировано множество биологических прогностических параметров, таких как мутационный статус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (IGH), повторяющиеся цитогенетические аномалии (делеция 17p) [23], уровни

бета-2-микроглобулина и тимидинкиназы, экспрессия CD38, ZAP-70 и CD49d. Позднее исследователи обнаружили феномен стереотипии гена BCR (B-cell receptor – В-клеточный рецептор) и обосновали прогностическое значение некоторых подтипов BCR. С использованием технологии массивного параллельного секвенирования подтвержден гетерогенный мультиклональный пейзаж CLL. Повторяющиеся соматические мутации могут быть сгруппированы в соответствии с вариациями генов: 1) участвующих в ответе на повреждение ДНК и в контроле клеточного цикла (*TP53*, *ATM*, *RBI*, *BIRC3*), 2) являющихся звеньями пути передачи сигнала Notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *FBXW7*), 3) вовлеченных в развитие воспаления (*MYD88*, *DDX3X*, *MAPK1*), 4) определяющих процессинг РНК (*SF3B1*) и 5) опосредующих передачу сигнала посредством цитокинов (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*). Помимо мутаций некоторых генов (*TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1*), коррелирующих с неблагоприятным характером течения CLL, прогностическое значение других мутаций еще до конца не определено. Проведенными исследованиями подтверждена теория эволюции клонов при CLL и селекция субклональных драйверных мутаций под влиянием терапии. Значение этих сложных событий, вероятно, будет установлено в дальнейшем, а в настоящее время для выбора тактики лечения в рутинной клинической практике используются только клональные и субклональные мутации гена *TP53* [24].

Баланс сигналов, передаваемых посредством различных цитокинов, играет важную роль в регуляции неизменной функции иммунной системы. Его нарушение является основой патогенеза многочисленных иммуноопосредованных заболеваний, в частности злокачественных опухолей. Показано, что продукция цитокинов находится под контролем генетических факторов. В генах цитокинов, особенно в их промоторных регионах, обнаружены различные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP – single nucleotide polymorphisms). Некоторые из них связаны с различным уровнем экспрессии цитокинов, что влияет на уровень других цитокинов, участвующих в иммунном ответе. Исследованиями выявлена роль интерлейкина (IL)-10, фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$  и трансформирующего фактора роста (TGF)- $\beta$  в возникновении и развитии различных видов В-клеточных лимфом. Эти цитокины поддерживают рост и выживание неизменных и трансформированных клеток, включая В-лимфоциты, а также способствуют развитию резистентности к лекарственным средствам [39].

В последние годы появилось несколько новых вариантов терапии CLL, включая ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTK) ибрутиниб, инги-

битор дельта-изоформы фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) иделалисиб в комбинации с ритуксимабом, антагонист Vcl-2 – венетоклакс, а также новые антитела против CD20 – обинутумаб и офатумумаб. Большинство из этих препаратов уже включены в алгоритмы лечения CLL и отражены в международных практических рекомендациях. Тем не менее использование сочетания флударабина, циклофосамида и ритуксимаба (FCR) остается основным вариантом терапии первой линии большинства пациентов с CLL без делеции/мутации гена *TP53* и значимых сопутствующих соматических и инфекционных заболеваний. Данный вариант лечения особенно эффективен у больных с благоприятными молекулярно-генетическими характеристиками опухолевого клона, в том числе мутационным статусомIGHV [24].

Ритуксимаб способен ингибировать конститутивно активированный путь передачи сигнала ядерного фактора- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B – nuclear factor- $\kappa$ B) в трансформированных В-лимфоцитах, приводя к усилению чувствительности злокачественных клеток к химиотерапии [39].

Знание индивидуальных изменений профиля экспрессии генов у пациента может помочь в прогнозировании эффективности, степени токсичности терапии и в рациональной персонализации лечения. Фактически гены, связанные с ответом на противоопухолевую терапию, весьма многочисленны. Они влияют на структуру и функцию белков, участвующих в фармакодинамике лекарственных препаратов и в активации метаболизма; кодируют протеины, которые связаны с онкогенезом, супрессией опухолевого роста, процессом передачи сигнала в клетках и восстановлением ДНК, и являются мишенями (рецепторы, ферменты и т.д.) терапевтических средств [15].

Представленная работа отражает результаты фармакогенетических исследований, направленных на выявление ассоциаций между полиморфизмом генов иммунного ответа и эффективностью лечения FCR больных CLL.

## Материалы и методы

Материалом для исследования служила ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической венозной крови 33 больных с CLL (В стадия), у которых в последующем начата терапия по программе FCR. Среди пациентов наблюдались 23 (69,7%) мужчины и 10 (30,3%) женщин с медианой возраста 57 лет (39-77 лет). Оценка ответа на лечение выполнялась в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по CLL (IWCLL) в 2008 г. [21]. Все больные разделены на несколько групп в зави-

симости от сроков ответа на лечение. В первую группу включены три (9,1%) человека, у которых наступление частичной/полной ремиссии заболевания наблюдалось уже после первых двух курсов терапии. Вторую составили 13 (39,4%) пациентов с подтвержденной ремиссией CLL после четырех курсов FCR. Третью – 10 (30,3%) больных с ремиссией после шести курсов лечения и четвертую – 7 (21,2%) обследованных, у которых при использовании режима FCR достичь ремиссии не удалось. Первые три группы были условно объединены в пятую, включавшую в себя 26 (78,8%) человек, получивших эффект от терапии FCR.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов в 19 полиморфных участках 14 генов иммунного ответа (Toll-подобных рецепторов (TLR – toll-like receptors) *TLR2* (Arg753Cln), *TLR3* (Phe421Leu), *TLR4* (Thr399Ile), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (T-1237C, A2848G), *IL-1β* (T-31C, T-511C, G-1473C, C-3953T), *IL-2* (T-330G), *IL-4* (C-589T), *IL-6* (C-174G), *IL-10* (C-819T, G-1082A), *IL-17A* (G-197A), *CD14* (C-159T), *TNFα* (G-308A), *FCGR2A* (His166Arg)) проводили с использованием комплекта реагентов «SNP-экспресс» методом полимеразной

цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», Москва) на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК технология», Москва) 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 сравнения частот аллелей между различными группами применяли критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность. Дополнительно оценивали показатель отношения шансов – odds ratio (OR) – с вычислением границ 95%-го доверительного интервала (95% CI). Значение OR = 1 свидетельствовало об отсутствии ассоциации риска развития события с наблюдаемым генотипом; OR < 1 – об отрицательной ассоциации (фактор пониженного риска развития события); OR > 1 – о положительной ассоциации гаплотипа с риском развития события (фактор повышенного риска). Для анализа результатов использовали пакеты программ MS Office Excel 2003 STATISTICA V.13.2 и онлайн-калькулятор для расчета статистики при генетических исследованиях ([http://gen-exp.ru/calculator\\_or.php](http://gen-exp.ru/calculator_or.php)). В случаях множественных сравнений применяли

**ТАБЛИЦА 1. РАЗЛИЧИЯ В ЧАСТОТЕ ВЫЯВЛЕНИЯ ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *IL-10-1082*, *IL-1β-3953* И *FCGR2A-166* У БОЛЬНЫХ CLL 1 И 2 ГРУПП**

TABLE 1. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY OF *IL-10-1082*, *IL-1β-3953* AND *FCGR2A-166* GENE IN CLL PATIENTS OF THE 1<sup>ST</sup> AND 2<sup>ND</sup> GROUPS

Ген, генотип Gene, genotype	1 группа 1 group (n = 3)	2 группа 2 group (n = 13)	$\chi^2$	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>IL-10</i> (G-1082A)						
GG	0,333	0,692	10,09	0,006	0,22	0,02-3,22
GA	0,000	0,308			0,30	0,01-7,17
AA	0,667	0,000			45,00	1,40-1451,28
<i>IL-1β</i> (C-3953T)						
CC	0,000	0,727	6,75	0,009	0,06	0,00-1,46
CT	0,667	0,273			5,33	0,34-82,83
TT	0,333	0,000			13,80	0,42-448,24
<i>FCGR2A</i> (His166Arg)						
GG	0,000	0,308	10,09	0,006	0,30	0,01-7,17
GA	0,333	0,692			0,22	0,02-3,22
AA	0,667	0,000			45,00	1,40-1451,28

**Примечание.** Здесь и далее – результаты представлены в долях единицы;  $\chi^2$  – критерий Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность; p – уровень значимости различий; OR (odds ratio) – отношение шансов; 95% CI – доверительный интервал (confidence interval), в котором статистическая значимость различий параметра, полученного на основе исследования, имеет степень вероятности 95%.

Note. Here and below, the results are presented as fractions of total groups taken as 1;  $\chi^2$ , Pearson criterion with Yates correction for continuity; p, the significance level for the differences; OR, odds ratio; 95% CI is a confidence interval for 95%-statistical significance of the differences observed.

метод Бонферрони для контроля над групповой вероятностью ошибки. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Эффективность лечения оценивалась после проведения 2, 4 и 6 курсов терапии FCR на основании получения частичной или полной ремиссии CLL. Найдено, что 1 группу больных от 2 отличало преобладание мутантных гомозигот AA, AA, TT генов *IL-10* в позиции G-1082A; *IL-1β* в позиции C-3953T и *FCGR2A* в позиции His166Arg, что увеличивало шанс наступления

ремиссии после 2 курсов FCR в 45, в 14 и в 45 раз соответственно (табл. 1).

Пациентов 1 группы с достигнутой ремиссией после двух курсов FCR от больных 3 группы отличало преобладание гомозиготных носителей аллеля «дикого» типа генов *IL-10* в позиции G-1082A и *TLR9* в позиции A2848G, а также наличие гомозиготных и гетерозиготных носителей мутантного аллеля гена *IL-1β* в позиции C-3953T, что повышало шансы развития ремиссии в более ранние сроки в 12, 35 и в 21 раз соответственно (табл. 2).

Между пациентами, достигшими ремиссии после четырех (2 группа) и шести курсов (3 груп-

**ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *IL-10-1082*, *TLR9-2848* И *IL-1β-3953T* У БОЛЬНЫХ CLL 1 И 3 ГРУПП**

TABLE 2. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY OF *IL-10-1082*, *IL-1β-3953* AND *TLR9 A2848G* GENE IN CLL PATIENTS FROM THE 1<sup>ST</sup> AND 3<sup>RD</sup> GROUPS

Ген, генотип Gene, genotype	1 группа 1 group (n = 3)	3 группа 3 group (n = 10)	$\chi^2$	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>IL-10</i> (G-1082A)						
GG	0,333	0,000	6,24	0,04	12,60	0,39-411,13
GA	0,000	0,700			0,07	0,00-1,67
AA	0,667	0,300			4,67	0,30-73,39
<i>TLR9</i> (A2848G)						
AA	1,000	0,125	7,22	0,007	35,00	1,12-1094,80
AG + GG	0,000	0,875			0,03	0,00-0,89
<i>IL-1β</i> (C-3953T)						
CC	0,000	0,778	5,60	0,02	0,05	0,00-1,28
CT + TT	1,000	0,222			21,00	0,78-564,18

**ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ И ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *TLR9-2848*, *IL-10-1082A* И *CD14-159T* У БОЛЬНЫХ CLL 2 И 3 ГРУПП**

TABLE 3. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY FOR *TLR9-2848*, *IL-10-1082A* AND *CD14-159T* IN CLL PATIENTS FROM THE 2<sup>ND</sup> AND 3<sup>RD</sup> GROUPS

Аллель, ген, гаплотип Allele, gene, haplotype	2 группа 2 group (n = 13)	3 группа 3 group (n = 10)	$\chi^2$	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>TLR9</i> (A2848G)						
A	0,650	0,313	4,05	0,04	4,09	1,01-16,58
G	0,350	0,688			0,24	0,06-0,99
<i>IL-10</i> (G-1082A)						
GG	0,692	0,000	12,64	0,002	44,33	2,10-936,83
GA	0,308	0,700			0,19	0,03-1,14
AA	0,000	0,300			0,08	0,00-1,75
<i>CD14</i> (C-159T)						
CC + CT	1,000	0,700	4,49	0,03	12,60	0,57-278,23
TT	0,000	0,300			0,08	0,00-1,75

**ТАБЛИЦА 4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГАПЛОТИПОВ ГЕНОВ *TLR6-249*, *IL-10-819* И *TLR4-399ILE* У БОЛЬНЫХ CLL С НАЛИЧИЕМ И ОТСУТСТВИЕМ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ FCR**

TABLE 4. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY FOR *TLR6-249*, *IL-10-819* AND *TLR4-399ILE* GENES IN CLL PATIENTS RESPONDING vs RESISTANT TO FCR THERAPY

Генотипы Genotypes	4 группа 4 group (n = 7)	5 группа 5 group (n = 26)	$\chi^2$	p	OR values	
					Значение Value	95% CI
<i>TLR6</i> (Ser249Pro)						
GG	0,714	0,308	4,06	0,04	5,63	0,89-35,39
GA	0,286	0,500			0,40	0,07-2,45
AA	0,000	0,192			0,26	0,01-5,30
<i>IL-10</i> (C-819T)						
CC	1,000	0,577	4,44	0,04	11,33	0,58-215,34
CT + TT	0,000	0,423			0,09	0,00-1,74
<i>TLR4</i> (Asp399Ile)						
CC + CT	0,750	1,000	5,47	0,02	0,05	0,00-1,62
TT	0,250	0,000			18,43	0,62-549,00

**ТАБЛИЦА 5. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА *IL-10-1082* В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ CLL, ПОЛУЧАВШИХ ТЕРАПИЮ FCR**

TABLE 5. DIFFERENCES IN HAPLOTYPE FREQUENCY FOR *IL-10-1082* GENE IN GROUPS OF CLL PATIENTS TREATED WITH FCR THERAPY

Гаплотипы Haplotypes	1 группа 1 group (n = 3)	2 группа 2 group (n = 13)	3 группа 3 group (n = 10)	4 группа 4 group (n = 7)
GG	0,333	0,692	0,000	0,571
GA	0,000	0,308	0,700	0,429
AA	0,667	0,000	0,300	0,000

па) FCR, также были найдены различия распределения ряда исследованных иммуногенетических маркеров (табл. 3).

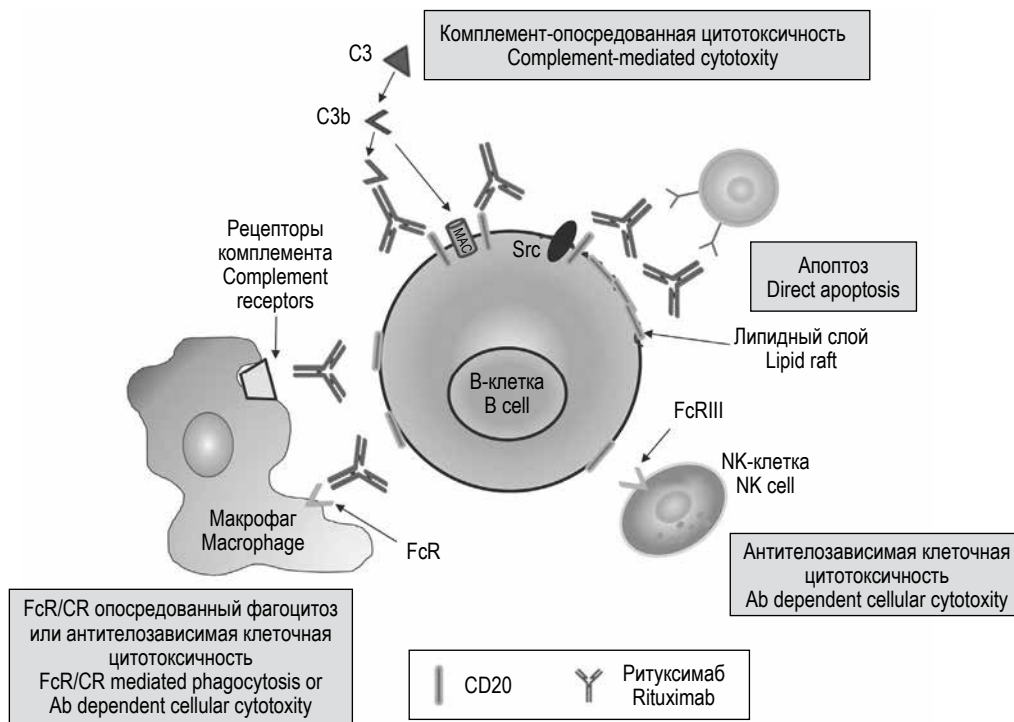
Во 2 группе наблюдалось преобладание в гаплотипах гена *TLR9* в позиции A2848G аллеля «дикого» типа А, аллеля «дикого» типа А в гомозиготном состоянии гена *IL-10* в позиции G-1082A и гаплотипов гена *CD14* с аллелем «дикого» типа в гомо- и гетерозиготном состоянии в позиции C-159T, что повышало шанс наступления ремиссии в более ранние сроки в 4, 44 и в 12 раз соответственно.

При сравнении группы больных, резистентных к назначенной терапии (4 группа), и обобщенной группы пациентов, ответивших на лечение FCR (5 группа), найдено, что гомозиготное носительство аллелей «дикого» типа С генов *TLR6* в позиции Ser249Pro и *IL-10* в позиции C-819T повышало шансы развития первично-резистентного к FCR CLL почти в 5 и в 11 раз соответственно, а преобладание носительства мутантного аллеля Т гена *TLR4* в позиции Asp399Ile в гомозиготном состоянии снижало шансы раз-

вития ответа на лечение с использованием программы FCR в 18 раз (табл. 4).

Учитывая множественность сравнений выявленных гаплотипов, проведен анализ достоверности полученных результатов с применением поправки Бонферрони с целью контроля над групповой вероятностью ошибки. В результате найдено, что истинная связь между наблюдаемыми гаплотипами генов иммунного ответа во всех выделенных группах пациентов с CLL, получавших терапию FCR, и со сроками ответа на лечение или отсутствием такового обнаружена для гена *IL-10* в позиции G-1082A ( $p < 0,01$ ;  $\chi^2 = 20,082$ ) (табл. 5).

Найденные в работе статистически значимые различия в частоте гаплотипов генов *IL-1 $\beta$*  (C-3953T), *IL-10* (C-819T), *FCGR2A* (His166Arg), *TLR4* (Thr399Ile), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR9* (A2848G), *CD14* (C-159T) при проверке гипотезы достоверности в результате множественных сравнений не подтвердили свою значимость. Необходимы дальнейшие исследования с увеличением числа наблюдений во всех выделенных группах



**Рисунок 1. Предположительный механизм действия ритуксимаба (модифицировано из [15])**

Figure 1. A proposed mechanism of Rituximab action (modified from [15])

пациентов, которые смогут либо установить, либо исключить участие этих генов в реализации ответа на терапию FCR при CLL.

Таким образом, определение мутационного статуса гена *IL-10* (G-1082A) можно рекомендовать для прогнозирования развития ответа с использованием программной терапии FCR у больных CLL до начала лечения, что позволит скорректировать на начальном этапе тактику ведения пациентов с первично-резистентными формами заболевания.

## Обсуждение

Ритуксимаб – один из компонентов программы терапии FCR, представляет собой гуманизированное IgG1 моноклональное антитело (mAb), имеющее два домена: фрагмент ab (Fab), связывающий антиген CD20 на В-лимфоцитах, и фрагмент с (Fc) – Fc-гамма-рецептор (FcγR) на эффекторных клетках. Образование комплекса ритуксимаба с CD20<sup>+</sup> и иммунокомпетентными клетками, экспрессирующими Fc-рецепторы (NKK – естественные киллеры и макрофаги), приводит к запуску антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC – antibody depended cellular cytotoxicity) [15]. Механизмы действия ритуксимаба *in vivo* остаются не до конца понятыми и могут отличаться при различных подтипах В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний [19]. Активность препарата может быть

объяснена и некоторыми другими механизмами, в частности комплементзависимой цитотоксичностью (CDC – complement-depended cytotoxicity), индукцией апоптоза и повышением чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическому влиянию химиотерапии (рис. 1) [15, 19].

Поскольку связывание ритуксимаба с CD20 индуцирует лизис и апоптоз всех CD20<sup>+</sup> экспрессирующих клеток, в том числе неопухолевых В-лимфоцитов, влияние этого препарата на обычные функции иммунной системы, особенно на те, которые осуществляются В-клетками, представляет интерес [33]. В процессе развития В-лимфоцитов CD20 сначала появляется на поздних про-В-клетках и затем конститутивно присутствует на пре-В, незрелых, наивных зрелых В-лимфоцитах и примированных антигеном В-клетках памяти. Экспрессия CD20 непостоянна на промежуточных антителосекретирующих плазмобластах и отсутствует на терминально дифференцированных плазматических клетках [38]. Истощение пула неопухолевых В-лимфоцитов в периферической крови у пациентов, пролеченных ритуксимабом, однако, не сопровождается изменением уровней циркулирующих иммуноглобулинов в течение более 18 недель, что свидетельствует о сохранности субпопуляций плазмобластов и плазматических клеток [2]. Восполнение утраченного в результате терапии числа В-лимфоцитов возможно за счет подтипа регуляторных В-клеток (Bregs),

называемых В10-клетками по их способности продуцировать ИЛ-10 [7, 19, 33]. Предполагается, что ИЛ-10 является цитокином, необходимым для дифференцировки плазмобластов и плазматических клеток, секреция которого может привести к параллельному развитию Вregs [33].

Ритуксимаб и другие таргетные препараты, направленные против CD20, являются весьма эффективными терапевтическими средствами лечения различных видов неходжкинских лимфом (NHL – non-Hodgkin's lymphoma), несмотря на то что опухолевые клетки, так же как и неизменные В-лимфоциты, обычно не экспрессируют антиген CD20 чрезмерно. На трансформированных клетках при NHL наблюдается выраженная экспрессия рецептора ИЛ-10 (ИЛ-10R), связывание с которым предполагает более избирательное влияние на них, чем на обычные В-лимфоциты, таргетных анти-ИЛ-10 лекарственных препаратов. Вregs являются типичной субпопуляцией неизменных В-лимфоцитов с максимальной экспрессией ИЛ-10 и ИЛ-10R, оказывающей иммуносупрессивное действие на функционирование Т-лимфоцитов-хелперов (Th) Th1, Th17 и регуляторных Т-клеток (Tregs). Вregs напоминают клетки врожденного иммунитета – В-1а, которые возникают из В-клеток-предшественников Т2 маргинальной зоны. Взаимодействие клеток-предшественников В10pro с TLR4 и TLR9 приводит к чрезмерной продукции ИЛ-10 и их созреванию в В10-клетки. Передача сигнала через MyD88, который часто мутирует, например при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma), и усиливает продукцию ИЛ-10. Предполагается, что применение anti-ИЛ-10R в качестве лекарственного средства может активировать реализацию противоопухолевого иммунного ответа, элиминируя опухолевые клетки, продуцирующие высокие уровни ИЛ-10, тем самым устраняя ИЛ-10-зависимый иммуносупрессивный паракринный эффект. Возможно, с уменьшением количества Вregs будет создаваться более благоприятное микроокружение для развития Tregs и Th1-клеток. Таким образом, таргетные препараты к ИЛ-10R являются многообещающими [7, 19].

Обнаружено, что полиморфизмы в генах, участвующих в фармакодинамике ритуксимаба (CD20, FcγRIIIA, FcγRIIA и C1q), могут частично обуславливать гетерогенность результатов лечения и выступать в качестве прогностических маркеров исходов лечения [15].

Полиморфизм проявляется в изменении последовательности ДНК гена, который встречается в популяции с частотой  $\geq 1\%$ , что приводит к нарушениям экспрессии, структуры и функции кодируемого геном белка. Однонуклеотид-

ный полиморфизм представляет собой замену только одного нуклеотида и является примером наиболее распространенной мутации, обнаруживаемой в каждой тысяче пар оснований генома человека. SNP обычно присутствуют во фланкирующих областях протеин-кодирующих генов (предназначены для связывания микроРНК и для регуляции экспрессии белка), затрагивая последовательности экзонов, интронов или области, являющиеся границей между экзонами и интронами, а также сайты сплайсинга. Некоторые более сложные полиморфизмы, такие как набор мини/микросателлитных повторов (VNTR – различное число tandemных повторов) или копии гена (CNV – вариации числа копий), играют важную роль в синтезе определенного количества мРНК и продуцируемого белка. При миссенс-мутациях происходит замещение одного аминокислотного остатка другим, что приводит к модификации последовательности протеина. Синонимичные (молчащие) полиморфизмы могут влиять на функцию белка, обуславливая более медленный синтез протеина, несовершенную структуру белка, продукцию протеина с частичными функциями и полностью неактивного белка [15].

В проведенной ранее работе мы идентифицировали полиморфные варианты генов иммунного ответа у больных CLL, ассоциированные с различной скоростью прогрессирования заболевания. Установлен ряд корреляционных связей распределения модификационных профилей генов при доброкачественной и прогрессирующей формах CLL. Так, на доброкачественный характер течения CLL и, следовательно, выживаемость пациентов уже в момент постановки диагноза указывает присутствие мутантных аллелей генов *TNF* (G-308A), *TLR9* (T-1237C) и *TLR2* (Arg753Gln), а также низкая частота выявления аллеля «дикого» типа гена *IL-6* (C-174G). Кроме того, определение комбинации нормальных гомозигот генов *TNF*, *TLR9* и *TLR2* коррелирует с развитием прогрессирующей формы заболевания. В связи с этим мы предположили, что использование генетических прогностических маркеров в клинической практике может способствовать оптимизации выбора терапии [1].

В представленном нами исследовании впервые проведен довольно широкий обзор полиморфизмов генов, участвующих в реализации иммунного ответа у больных CLL, пролеченных по протоколу FCR. Найдена достоверная связь между наблюдаемыми гаплотипами генов иммунного ответа во всех выделенных группах пациентов с CLL, получавших терапию FCR, со сроками ответа на лечение или отсутствием та-



кового с мутационным статусом (rs1800896) гена *IL-10* в позиции G-1082A ( $p < 0,01$ ;  $\chi^2 = 20,082$ ).

Промоторная область гена *IL-10*, расположенного на хромосоме 1 (1q31-1q32), может содержать три типичных SNP: rs1800896, rs1800871 и rs1800872 [6, 25]. Только один из них – rs1800896, вероятнее всего, влияет на уровень кодируемого данным геном цитокина. Наличие аллеля «дикого» типа в гаплотипе гена ассоциируется со сниженным уровнем секреции IL-10, а мутантный аллель – с его более высоким содержанием [6]. Исследования взаимоотношения между полиморфизмом гена *IL-10* с вероятностью возникновения лимфом подтвердили связь вариантов rs1800890, rs1800896, rs1800871 и rs1800872 с повышенным риском развития NHL [25].

Ген *IL-10* кодирует один из противовоспалительных цитокинов – IL-10, который в основном секретируется моноцитами, Th2, Tregs, активированными Т- и В-лимфоцитами [7, 11, 12, 14, 17, 18, 20, 22, 25, 26, 27, 29, 31]. Этот цитокин является фактором роста обычных активированных В-лимфоцитов человека и В-клеточных линий лимфом [30, 36]. Он контролирует баланс между клеточным и гуморальным иммунными ответами, обладает выраженной иммуносупрессивной активностью, стимулирует пролиферацию опухолевых клеток. IL-10 подавляет высвобождение и активность провоспалительных цитокинов, секретируемых Th1 и макрофагами (интерферон [IFN – interferon]- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF $\alpha$ ), а также экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса [7, 25]. Такой дисбаланс соотношения Th1/Th2, вызываемый в том числе различными генетическими полиморфизмами, может быть одним из компонентов патогенеза различных типов NHL [25].

Передача сигнала IL-10 осуществляется через рецептор IL-10R, который состоит из двух субъединиц: IL-10R $\alpha$  и IL-10R $\beta$ . Связывание цитокина с рецептором приводит к аутофосфорилированию субъединицы IL-10R $\alpha$ , активации IL-10R $\alpha$ -ассоциированной Янус-киназы 1 (JAK1) или IL-10R $\alpha$ -ассоциированной ТЫК2 киназы. Стимуляция JAK1 и ТЫК2 запускает последующую индукцию белков семейства STAT (преобразователь сигнала и активатор транскрипции). IL-10 в основном передает сигнал через STAT3 и в гораздо меньшей степени – через STAT1, STAT5 и STAT6. После фосфорилирования аминокислотных остатков Tyr705 и Ser737 STAT3 транслоцируется в ядро, где влияет на экспрессию нижележащих генов, содержащих едиобразные гамма-активированные сайты (GAS) мотивов ДНК. Сам промотор гена STAT3 включает в себя мотив GAS, поэтому его активация инициирует цикл самопроизвольной

стимуляции, приводящий к увеличению уровня нефосфорилированного STAT3. Показано, что фосфорилированный STAT3 и его нефосфорилированная форма могут перемещаться в ядро и активировать нижележащие гены [7].

Актуальность изучения IL-10 при различных типах NHL доказана на примере DLBCL. Установлено участие взаимоотношений IL-10-JAK1/2-STAT3 в выживании, пролиферации опухолевых клеток, а также в эффективности лечения больных DLBCL. Отмечено, что высокие уровни сывороточного IL-10 наблюдались у пациентов с более агрессивным характером заболевания, активируя *ex vivo* JAK2 и STAT3. JAK2-специфический ингибитор, который может прерывать аутокринную секрецию IL-10 и активацию комплекса JAK2/STAT3. Стимуляция STAT3 в основном способствует выживанию клеток при ABC типе DLBCL, и использование ингибиторов JAK приводит к апоптозу опухолевых клеток. Так как при DLBCL выявляется выраженная экспрессия IL-10R с последующей индукцией передачи сигнала STAT3, считается, что блокирование IL-10R приводит к прерыванию передачи сигнала IL-10, остановке клеточного цикла и к апоптозу трансформированных клеток. IL-10 является необходимым звеном для передачи сигнала путем NF- $\kappa$ B, который активируется при различных типах NHL и вносит вклад в процесс самостоятельной стимуляции NF- $\kappa$ B через STAT3. IL-10 также способствует пролиферации неизмененных В-клеток путем активации BCR или CD40. У больных DLBCL высокая сывороточная концентрация IL-10 является биологическим маркером неблагоприятных результатов лечения [7]. Найдено, что более высокие уровни сывороточного IL-10 связаны с плохим прогнозом заболевания у пациентов с другими видами NHL и лимфомой Ходжкина [9, 27, 28, 37]. IL-10 в гематопозитических клетках и клетках лимфомы регулирует экспрессию bcl-2, члена семейства протеинов Bcl-2, участвующих в апоптозе [41]. Bcl-2 играет ключевую роль в способности опухолевых клеток выживать при воздействии цитотоксических стимулов и обуславливает развитие резистентности к апоптогическим сигналам [13, 35, 40]. Выраженной экспрессией bcl-2 и/или IL-10 у некоторых пациентов объясняется неэффективность, например, терапии СНОР при DLBCL. Однако добавление в схему лечения ритуксимаба изменяет клеточную и молекулярную трансдукцию сигнала, регулируя экспрессию bcl-2, особенно у bcl-2-позитивных пациентов с DLBCL [3, 4, 5, 10, 15].

При CLL показано, что сывороточный уровень IL-10 коррелировал со стадией заболевания, по Rai и соавт. [34], и был максимально высоким

у больных с III-IV стадиями CLL по сравнению с 0-II стадиями. Параллельное увеличение числа Tregs, обладающих иммуносупрессивными свойствами, ингибировало функцию других эффекторных Т-клеток, приводя к прогрессированию заболевания. В свою очередь, IL-10, секретируемый Treg, может ингибировать рост и дифференцировку Th17-клеток, что также негативно отражается на течении и прогнозе заболевания. Найдено, что число Tregs и сывороточное содержание IL-10 значительно снижались у больных CLL в ремиссии заболевания, так как терапия способствует апоптозу Tregs и уменьшению продукции IL-10, вызывая гибель неопластических клеток [32].

Эти наблюдения подчеркивают клиническую значимость фармакогенетических исследований в онкогематологии и предполагают необходимость дополнительных изысканий в целях индивидуализации терапии для ее эффективности и/или уменьшения риска неблагоприятных последствий. Однако следует отметить, что ряд факторов влияет на результаты генетического тестирования. К ним относятся протокол введения лекарственного средства, применение других

видов лечения (лучевая терапия, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, сопроводительное лечение), этническое происхождение пациентов, их возраст (у пожилых больных чаще наблюдаются побочные токсические эффекты терапии, чем у молодых), дизайн исследования с учетом количества пациентов, наличия контрольной группы, используемые конечные точки оценки эффективности, технологии, применяемые для анализа ДНК [15].

Следует иметь в виду, что присутствия одной из генетических особенностей недостаточно, чтобы описать индивидуальные различия, наблюдаемые при применении конкретных лекарственных средств. Это связано с тем, что фармакокинетика препарата весьма сложна и состоит из многих компонентов. Дифференцированный ответ на терапию, как правило, является результатом действия многих генов. Однако прогнозирование на ранних этапах эффективности каждого препарата или комбинации лекарственных средств у каждого пациента позволит достичь успеха в терапии и снизить возможность развития побочных эффектов лечения [15].

## Список литературы / References

1. Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Докшина И.А., Зотина Е.Н. Модификации генов иммунного ответа при различных типах течения хронического лимфолейкоза // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2015. Т. XXII, № 1. С. 21-24. [Nazarova E.L., Shardakov V.I., Demyanova V.T., Dokshina I.A., Zotina E.N. Modification of immune response genes in various types of chronic lymphocytic leukemia. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova = Record of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*, 2015, Vol. XXII, no. 1, pp. 21-24. (In Russ.)]
2. Aklilu M., Stadler W.M., Markiewicz M., Vogelzang N.J., Mahowald M., Johnson M., Gajewski T.F. Depletion of normal B cells with rituximab as an adjunct to IL-2 therapy for renal cell carcinoma and melanoma. *Ann. Oncol.*, 2004, Vol. 15, no. 7, pp. 1109-1114.
3. Alas S., Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2003, Vol. 9, no. 1, pp. 316-326.
4. Alas S., Bonavida B. Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 13, pp. 5137-5144.
5. Alas S., Emmanouilides C., Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 2001, Vol. 7, no. 3, pp. 709-723.
6. Baran W., Szepietowski J.C., Mazur G., Baran E. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms in psoriasis vulgaris. *Acta Derm. Venereol.*, 2008, Vol. 88, no. 2, pp. 113-116.
7. Béguelin W., Sawh S., Chambwe N., Chan F.C., Jiang Y., Choo J.-W., Scott D.W., Chalmers A., Geng H., Tsikitas L., Tam W., Bhagat W., Gascoyne R.D., Shaknovich R. IL-10 receptor is a novel therapeutic target in DLBCLs. *Leukemia*, 2015, Vol. 29, no. 8, pp. 1-11.
8. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981, Vol. 48, no. 1, pp. 198-206.
9. Blay J.Y., Burdin N., Rousset F., Lenoir G., Biron P., Philip T., Banchereau J., Favrot M.C. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. *Blood*, 1993, Vol. 82, no. 7, pp. 2169-2174.
10. Cartron G., Watier H., Golay J., Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 9, pp. 2635-2642.

11. Chen Y., Zheng T., Lan Q., Foss F., Kim C., Chen X., Dai M., Li Y., Holford T., Leaderer B., Boyle P., Chanock S.J., Rothman N., Zhang Y. Cytokine polymorphisms in Th1/Th 2 pathway genes, body mass index, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 2, pp. 585-590.
12. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 174, no. 5, pp. 1209-1220.
13. Domen J., Gandy K.L., Weissman I.L. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood*, 1998, Vol. 91, no. 7, pp. 2272-2282.
14. Domingo-Domènech E., Benavente Y., González-Barca E., Montalban C., Gumà J., Bosch R., Wang S.S., Lan Q., Whitby D., Fernández de Sevilla A., Rothman N., de Sanjosé S. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. *Haematologica*, 2007, Vol. 92, no. 11, pp. 1475-1481.
15. Falduto A., Cimino F., Speciale A., Musolino C., Gangemi S., Saija A., Allegra A. How gene polymorphisms can influence clinical response and toxicity following R-CHOP therapy in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev.*, 2017, Vol. 31, no. 4, pp. 235-249.
16. Fayad L., Keating M.J., Reuben J.M., O'Brien S., Lee B.N., Lerner S., Kurzrock R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 1, pp. 256-263.
17. Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 1989, Vol. 170, no. 6, pp. 2081-2095.
18. Fiorentino D.F., Zlotnik A., Vieira P., Mosmann T.R., Howard M., Moore K.W., O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 10, pp. 3444-3451.
19. Gagez A.L., Tuailon E., Cezar R., Dartigeas C., Mahé B., Letestu R., Maisonneuve H., Gouilleux-Gruart V., Bollore K., Ferrant E., Aurran T., Feugier P., Leprêtre S., Cartron G. Response to rituximab in B-CLL patients is adversely impacted by frequency of IL-10 competent B cells and FcγRIIIa polymorphism. A study of FCGCLL/WM and GOELAMS groups. *Blood Cancer J.*, 2016, Vol. 6, e389. doi: 10.1038/bcj.2015.115.
20. Habermann T.M., Wang S.S., Maurer M.J., Morton L.M., Lynch C.F., Ansell S.M., Hartge P., Sevenson R.K., Rothman N., Davis S., Geyer S.M., Cozen W., Chanock S.J., Cerhan J.R. Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 7, pp. 2694-2702.
21. Hohaus S., Giachelia M., di Febo A., Martini M., Massini G., Vannata B., D'Alò F., Guidi F., Greco M., Pierconti F., Larocca L.M., Voso M.T., Leone G. Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.*, 2007, Vol. 18, no. 8, pp. 1376-1381.
22. Huang S.J., Lee L.J., Gerrie A.S., Gillan T.L., Bruyere H., Hrynychak M., Smith A.C., Karsan A., Ramadan K.M., Jayasundara K.S., Toze C.L. Characterization of treatment and outcomes in a population-based cohort of patients with chronic lymphocytic leukemia referred for cytogenetic testing in British Columbia, Canada. *Leuk. Res.*, 2017, Vol. 55, pp. 79-90.
23. Jamrozik K., Puła B., Walewski J. Current treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2017, Vol. 18, no. 1, p. 5.
24. Kim M.K., Yoon K.-A., Park E.Y., Joo J., Lee E.Y., Eom H.-S., Kong S.-Y. Interleukin-10 polymorphisms in association with prognosis in patients with B-cell lymphoma treated by R-CHOP. *Genomics Inform.*, 2016, Vol. 14, no. 4, pp. 205-210.
25. Kube D., Hua T.D., von Bonin F., Schoof N., Zeynalova S., Klöss M., Gocht D., Potthoff B., Tzvetkov M., Brockmüller J., Löffler M., Pfreundschuh M., Trümper L. Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 12, pp. 3777-3784.
26. Lan Q., Zheng T., Rothman N., Zhang Y., Wang S.S., Shen M., Berndt S.I., Zahm S.H., Holford T.R., Leaderer B., Yeager M., Welch R., Boyle P., Zhang B., Zou K., Zhu Y., Chanock S. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2006, Vol. 107, no. 10, pp. 4101-4108.
27. Lech-Maranda E., Baseggio L., Bienvenu J., Charlot C., Berger F., Rigal D., Warzocha K., Coiffier B., Salles G. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 9, pp. 3529-3534.
28. Lech-Maranda E., Baseggio L., Charlot C., Rigal D., Berger F., Jamrozik K., Warzocha K., Coiffier B., Salles G. Genetic polymorphisms in the proximal IL-10 promoter and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, 2007, Vol. 48, no. 11, pp. 2235-2238.
29. Miyazaki I., Cheung R.K., Dosch H.M. Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.*, 1993, Vol. 178, no. 2, pp. 439-447.
30. O'Garra A., Stapleton G., Dhar V., Pearce M., Schumacher J., Rugo H., Barbis D., Stall A., Cupp J., Moore K., Vieira P., Mosmann T., Whitmore A., Arnold L., Haughton G., Howard M. Production of cytokines by mouse B cell: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol.*, 1990, Vol. 2, no. 9, pp. 821-832.

31. Pang N., Zhang R., Li J., Zhang Z., Yuan H., Chen G., Zhao F., Wang L., Cao H., Qu J., Ding J. Increased IL-10/IL-17 ratio is aggravated along with the prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, Vol. 40, pp. 57-64.
32. Qiu H., Li J., Feng Z., Yuan J., Lu J., Hu X., Gao L., Lv S., Yang J., Chen L. CD19(+) CD20(-) CD27(hi) IL-s10-producing B cells are overrepresented in R-CHOP-treated DLBCL patients in complete remission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2016, Vol. 43, no. 9, pp. 795-801.
33. Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P., Chanana A.D., Levy R.N., Pasternack B.S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975, Vol. 46, no. 2, pp. 219-234.
34. Reed J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol. Lett.*, 1995, Vol. 82-83, pp. 155-158.
35. Rousset F., Garcia E., Defrance T., Peronne C., Vezzio N., Hsu D.H., Kastelein R., Moore K.W., Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Immunology*, 1992, Vol. 89, no. 5, pp. 1890-1893.
36. Sarris A.H., Kliche K.O., Pethambaram P., Preti A., Tucker S., Jackow C., Messina O., Pugh W., Hagemester F.B., McLaughlin P., Rodriguez M.A., Romaguera J., Fritsche H., Witzig T., Duvic M., Andreeff M., Cabanillas F. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann. Oncol.*, 1999, Vol. 10, no. 4, pp. 433-440.
37. Shapiro-Shelef M., Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 3, pp. 230-242.
38. Tarabar O., Cikota-Aleksić B., Tukić L., Milanović N., Aleksić A., Magić Z. Association of interleukin-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  gene polymorphisms with the outcome of diffuse large B-cell lymphomas. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 19, no. 1, pp. 186-192.
39. Tsujimoto Y. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 a protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene*, 1989, Vol. 4, no. 11, pp. 1331-1336.
40. Weber-Nordt R.M., Henschler R., Schott E., Wehinger J., Behringer D., Mertelsmann R., Finke J. Interleukin-10 increases Bcl-2 expression and survival in primary human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 1996, Vol. 88, no. 7, pp. 2549-2558.

---

**Авторы:**

**Назарова Е.Л.** — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

**Сухорукова Э.Е.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

**Минаева Н.В.** — к.м.н., заместитель директора по лечебной работе ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

**Шардаков В.И.** — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

**Фокина Е.С.** — к.м.н., врач-ординатор клинико-диагностического отделения ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

**Authors:**

**Nazarova E.L.**, PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

**Sukhorukova E.E.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

**Minaeva N.V.**, PhD (Medicine), Deputy Director for Clinics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

**Shardakov V.I.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

**Fokina E.S.**, PhD (Medicine), Resident Physician, Department of Clinical Diagnostics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

---

Поступила 02.10.2017

Отправлена на доработку 10.10.2017

Принята к печати 16.10.2017

---

Received 02.10.2017

Revision received 10.10.2017

Accepted 16.10.2017