

ОБ ОЦЕНКЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ОПУХОЛЯХ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Назарова Е.Л., Шардаков В.И., Демьянова В.Т., Загоскина Т.П.,
Зотина Е.Н.

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России», г. Киров, Россия

Резюме. При ряде солидных опухолей найдено, что исследование полиморфизма некоторых генов цитокинов позволяет использовать эти маркеры в качестве предикторов клинических исходов опухолевых заболеваний. Представлялось важным оценить связь уровня продукции про- и противовоспалительных цитокинов и корцепторных молекул с полиморфизмом промоторных участков генов цитокинов, вовлеченных в регуляцию клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, метаболизма липидов и свертывания крови при гемобластозах. В статье представлены результаты исследования ассоциации уровня продукции интерлейкинов-1 β , -2, -4, -10, -17, фактора некроза опухоли- α и аллельного полиморфизма их генов у 62 больных В-клеточными опухолями лимфатической системы в этнически гомогенной группе (идентифицирующих себя как русские). Показано, что генотипы GA и AA полиморфного маркера G-308A гена TNF α достоверно связаны с высокой продукцией этого цитокина и чаще встречаются при агрессивных формах неходжкинских лимфом, реже – при множественной миеломе и при индолентном течении неходжкинских лимфом.

Ключевые слова: В-клеточные опухоли лимфатической системы, полиморфизм генов, цитокины, рецепторы

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-5-431-436>

Введение

Цитокины – растворимые протеины или гликопротеины, действуют как медиаторы межклеточных взаимодействий и являются неотъемлемой частью функционирования иммунной системы. Цитокины плеiotропны и их многократно дублирующие функции зависят от их локальной концентрации, типа и стадии созревания отвечающих клеток, а также присутствия других цитокинов и их медиаторов. Роль цитокинов в биологии различных неопластических заболеваний интенсивно изучается. Цитокины aberrантно продуцируются опухолевыми клетка-

ми, макрофагами и другими фагоцитирующими клетками [4, 5].

Первоначально предложенный для эпидемиологических исследований интегративный подход молекулярной эпидемиологии состоит в том, что одни и те же гены, предрасполагающие к развитию опухолей, также могут участвовать и в определении исходов данных заболеваний [10]. В качестве примера интегративной концепции эпидемиологии можно привести результаты исследования у больных раком легкого, которое показало, что полиморфизм генов цитокинов интерлейкина (IL)-1A и -1B являлся фактором

Авторы:

Назарова Е.Л. – к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России», г. Киров, Россия

Шардаков В.И. – д.м.н., профессор, руководитель лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России», г. Киров, Россия

Демьянова В.Т. – к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России», г. Киров, Россия

Загоскина Т.П. – к.м.н., доцент, руководитель гематологической клиники ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России», г. Киров, Россия

Зотина Е.Н. – младший научный сотрудник ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России», г. Киров, Россия

Адрес для переписки:

Назарова Елена Львовна
к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства России»
610027, Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 72.
Тел.: 8 (922) 920-89-01.
Факс: 8 (8332) 54-97-31.
E-mail: center.deputy@mail.ru

Поступила 17.12.2013

Принята к печати 16.01.2014

© Назарова Е.Л. и соавт., 2014

риска развития как самого заболевания, так и тяжелого болевого синдрома [8]. Поэтому была выдвинута гипотеза об оценке полиморфизма генов цитокинов в качестве потенциальных маркеров генетической предрасположенности к различным опухолевым симптомам: болевому, астено-вегетативному синдромам и депрессии [9].

Наиболее вероятное клиническое значение исследования полиморфизмов некоторых генов цитокинов — это использование найденных генотипов в качестве предикторов клинических исходов опухолевых заболеваний. Некоторые гены цитокинов и их полиморфизмы являются одними из важных кандидатов для изучения связи с наличием тех или иных симптомов опухолей, обусловленных известными биологическими свойствами этих цитокинов. Так, IL-1 участвует в активации Т-клеток и индукции экспрессии молекул адгезии. IL-1 вовлечен в развитие болевого синдрома, а пациенты, гетерозиготные по *IL1-511C→T*, в 3 раза чаще испытывают симптомы депрессии, чем гомозиготные носители *CC* [3,6]. IL-2 — ключевой цитокин Т-хелперов I типа и действует как фактор роста и активации Т-лимфоцитов, натуральных киллерных и В-клеток. Этот цитокин стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов, усиливает цитотоксичность, увеличивает секрецию интерферона (IFN)-α и других цитокинов, и наличие полиморфизма в промоторном регионе *IL2 -330T→C* часто ассоциировано с усилением продукции этого цитокина и развитием выраженного болевого синдрома [11]. IL-4 — противовоспалительный цитокин, который обладает и провоспалительной активностью, продуцирующийся Т-хелперами 2 типа и тучными клетками. Он является ростовым фактором для В-клеток и стимулирует синтез IgE и IgG. При опухолевых заболеваниях IL-4 также играет роль в реализации болевого синдрома и обеспечивает защиту от нейротоксичности [14]. IL-10 ингибирует продукцию Т-хелперов 1 типа и функционирование макрофагов. Он в основном выполняет противовоспалительную функцию. Присутствие аллеля *-1082G* ассоциировано с высокой продукцией IL-10 и формированием болевого синдрома [7]. IL-17 относится к группе провоспалительных цитокинов, продуцируется Т-хелперами 17 типа в ответ на IL-23. Усиление экспрессии синтеза IL-17 отмечено при ряде опухолей, включая множественную миелому (ММ). Генетические полиморфизмы в генах семейства IL-17 ассоциированы с развитием аутоиммунных реакций [12]. Фактор некроза опухоли (TNF)-α участвует в развитии опухолевой кахексии, усилении болевого синдрома, а также в обеспечении ней-

ропротекторной функции. Генетический полиморфизм в промоторном регионе *TNF* изменяет продукцию цитокина. Так, полиморфизм в регионе *-308G→A* приводит к усилению экспрессии *TNFα in vitro* и *in vivo* [13].

Гены цитокинов высокополиморфны. Полиморфизмы обнаруживают в регуляторных регионах, включая промоторный и нетранслируемые регионы, которые во многих случаях могут влиять на экспрессию продукта гена *in vitro* [9]. Это важный факт, т.к. цитокины вовлечены в регуляцию многих биологических процессов, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, метаболизм липидов и свертывание крови при опухолевых заболеваниях.

Цель исследования: оценка ассоциированности уровня продукции про- и противовоспалительных цитокинов, а также корцепторных молекул с полиморфизмом промоторных участков генов цитокинов при В-клеточных опухолях лимфатической системы.

Материалы и методы

Обследовано 62 больных В-клеточными опухолями лимфатической системы (В-ОЛС), идентифицирующих себя как русские, в возрасте от 22 до 77 лет (медиана возраста — 59 лет). Среди них наблюдалось 36 мужчин (58,1%) и 26 женщин (41,9%). Материалом исследования служили сыворотка венозной крови, взятой из локтевой вены утром натощак, и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), выделенная из лейкоцитов периферической крови стандартным способом фенольно-хлороформной экстракции. Концентрацию IL-1β, IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNFα в сыворотке периферической крови оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с прилагаемой инструкцией к коммерческим наборам, производства ООО «Вектор-Бест» (Новосибирская обл., Россия). Оптическую плотность регистрировали на медицинском микропланшетном ридере Sunrise (Tecan, Австрия). Расчет содержания цитокинов проводили на основании построения калибровочной кривой с использованием программы MS Office Excel 2003. Геномное тестирование полиморфных участков исследуемых генов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с аллель-специфичными праймерами производства НПФ «Литех» (Россия) на амплификаторе «ДНК-технология» (Россия) 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. Анализ количественных показателей проводили на основании оценки непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Для расчета результатов использовали пакет программ STATISTICA V.12. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Предполагается, что исход и течение многих злокачественных новообразований зависят от баланса про- и противовоспалительных цитокинов. Поэтому научно-практический интерес сосредоточен в настоящее время на экспрессии генов этих цитокинов. В частности, значительное число исследований касаются влияния генетических полиморфизмов генов цитокинов на уровень их продукции и, следовательно, на иммунный ответ в целом [2]. Обзор результатов подобных исследований у больных В-ОЛС представлен в данной статье.

Как показало проведенное исследование, не было выявлено достоверной ассоциации полиморфных маркеров *T-31C* гена *IL1 β* , *T-330G* гена *IL2*, *C-590T* гена *IL4*, *C-819T* гена *IL10*, *G-197A* гена *IL17A* с сывороточными уровнями IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 соответственно. В таблице 1 приведены медианы, в скобках: 25- и 75-процентили количественных показателей.

Данные о влиянии полиморфизма промоторной области гена *TNF (G-308A)* на уровень выработки его белкового продукта противоречивы. С одной стороны, с аллелем *A* связывают более активную экспрессию гена *TNF* и повышенный синтез соответствующего цитокина. С другой стороны, показана ассоциация этого аллеля с пониженным содержанием в сыворотке крови TNF α . Вероятно, в организме человека, особенно у представителей различных популяций, на ассоциацию аллеля *A* с уровнем продукции белка влияет характер сцепления этого полиморфного маркера с близлежащими участками генома. Например, известно, что ген *TNF* лока-

ТАБЛИЦА 1. ЗАВИСИМОСТЬ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОТ ГЕНОТИПА ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ У БОЛЬНЫХ В-ОЛС

Ген	Генотип	Уровень соответствующего цитокина (пг/мл)	p
<i>IL-1</i>	CC	0 (0-3,8)	0,7391
	CT	0 (0-0,1)	
	TT	0,2 (0-0,4)	
<i>IL-2</i>	TT	0,5 (0,1-1,1)	0,6354
	TG	0,5 (0,1-1,2)	
	GG	0,4 (0-0,5)	
<i>IL-4</i>	CC	0,55 (0,2-0,9)	0,3595
	CT	0,8 (0,8-1,0)	
	TT	0,5 (0-0,8)	
<i>IL-10</i>	CC	5,2 (0,2-19,4)	0,7963
	CT	3,1 (0,6-10,1)	
	TT	3,7 (2,7-16,6)	
<i>IL-17A</i>	GG	6,4 (6,0-8,3)	0,5717
	GA	6,8 (6,5-9,0)	
	AA	7,1 (5,9-8,3)	

ТАБЛИЦА 2. ЗАВИСИМОСТЬ УРОВНЯ TNF α В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ В-ОЛС ОТ ГЕНОТИПОВ ПРОМОТОРНОГО РЕГИОНА ГЕНА *TNF*

Ген	Генотип	Уровень TNF α (пг/мл)	p
<i>TNF</i>	GG	5,05 (1,6-12,4)	0,6737
	GA	15,3 (11,7-25,8)	
	AA	11,1	
	Доминантная модель наследования		
	GG+GA AA	9,1 (2,4-16,7) 11,1	1,0000
	Рецессивная модель наследования		
	GG CA+AA	5,05 (1,6-12,4) 14,5 (11,1-25,8)	0,0020

ТАБЛИЦА 3. АССОЦИАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ТИПОВ В-ОЛС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПОВ РЕГИОНА G-308A ГЕНА TNF

Ген	Генотип	Индолентные НХЛ	Агрессивные НХЛ	ММ
TNF	GG	0,375	0,175	0,450
	GA	0,381	0,333	0,286
	AA	0	1,000	0
	GG+GA	0,377	0,230	0,393
	AA	0	1,000	0
	GG CA+AA	0,375 0,364	0,175 0,364	0,450 0,272

лизован вблизи локуса *HLA-DR*, аллель *HLA-DR2* которого ассоциирован с низким уровнем $TNF\alpha$, а аллель *HLA-DR3* — с его высокой концентрацией [1].

Для подтверждения связи между количественными показателями и аллелями полиморфного маркера *G-308A* гена *TNF* провели оценку сыровоточного содержания данного цитокина при наличии индивидуально выявленных генотипов и при комбинации генотипов в доминантной и рецессивной моделях наследования (табл. 2).

Было выявлено, что генотипы *GA* и *AA*, содержащие минорный аллель *A* полиморфного маркера *G-308A* гена *TNF*, достоверно связаны с более высокой продукцией этого цитокина, чем гомозиготы *GG*. Как известно, *A* аллель промоторного участка гена *TNF* служит более сильным активатором транскрипции данного гена и поэтому ассоциирован с повышенной продукцией $TNF\alpha$ и более тяжелым течением патологического процесса [13].

Среди больных В-ОЛС — носителей аллеля *A* промоторного участка *G-308A* гена *TNF* и, соответственно, содержащих в сыворотке периферической крови высокие концентрации это-

го цитокина, обладающего провоспалительной активностью, найдено, что генотипы *GA* и *AA* чаще встречаются при агрессивных формах неходжкинских лимфом (НХЛ), реже — при множественной миеломе (ММ) и в равной степени — при индолентном течении НХЛ. В таблице 3 частоты генотипов при различных формах В-ОЛС представлены в долях единицы.

Таким образом, современные достижения в области молекулярной биологии позволяют говорить, что полиморфизм генов цитокинов играет важную роль в развитии определенных типов опухолей, а также формировании характера течения заболевания.

Заключение

Показано, что среди исследованных генов цитокинов *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-10*, *IL-17*, $TNF\alpha$ аллель *A* полиморфного маркера *G-308A* гена *TNF* связан с повышенным синтезом фактора некроза опухоли- α и агрессивными формами неходжкинских лимфом и может быть расценен как маркер неблагоприятного течения В-клеточных опухолей лимфатической системы.

Список литературы / References

1. Гончарова И.А., Белобородова Е.В., Фрейдин М.Б., Белобородова Э.И., Черногорюк Г.Э., Пузырев В.П. Ассоциация полиморфных маркеров генов иммунной системы с количественными признаками, патогенетически значимыми для хронического вирусного гепатита // Молекулярная биология. 2008. Т. 42, № 2. С. 242-246. [Goncharova I.A., Beloborodova E.V., Freydin M.B., Beloborodova E.I., Chernogoryuk G.E., Puzyrev V.P. Assotsiatsiya polimorfnykh markerov genov immunnnoy sistemy s kolichestvennymi priznakami, patogeneticheski znachimymi dlya khronicheskogo virusnogo gepatita [Association of polymorphic markers of immune system genes with quantitative features important for the pathogenesis of chronic viral hepatitis]. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2008, Vol. 42, no. 2, pp. 242-246].
2. Bidwell J., Keen L., Gallagher G., Kimberly R., Huizinga T., McDermott M.F., Oksenberg J., McNicholl J., Pociot F., Hardt C., D'Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity*, 1999, Vol. 1, no. 1, pp. 3-19.
3. Honore P., Wade C.L., Zhong C., Harris R.R., Wu C., Ghayur T., Iwakura Y., Decker M.W., Faltynek C., Sullivan J., Jarvis M.F. Interleukin-1 α gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav. Brain Res.*, 2006, Vol. 167, no. 2, pp. 355-364.
4. Jin P., Panelli M.C., Marincola F.M., Wang E. Cytokine polymorphism and its possible impact on cancer. *Immunol. Res.*, 2004, Vol. 30, no. 2, pp. 181-190.
5. Kurzrock R. Cytokine deregulation in cancer. *Biomed. Pharmacother.*, 2001, Vol. 55, no. 9-10, pp. 543-547.

6. McCulley M.C., Day I.N., Holmes C. Association between interleukin 1-beta promoter (-511) polymorphism and depressive symptoms in Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 2004, Vol. 124B, no. 1, pp. 50-53.
7. Milligan E.D., Sloane E.M., Langer S.J., Hughes T.S., Jekich B.M., Frank M.G., Mahoney J.H., Levkoff L.H., Maier S.F., Cruz P.E., Flotte T.R., Johnson K.W., Mahoney M.M., Chavez R.A., Leinwand L.A., Watkins L.R. Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain. *Pain*, 2006, Vol. 126, no. 1-3, pp. 294-308.
8. Reyes-Gibby C.C., Spitz M., Wu X., Merriman K., Etzel C., Bruera E., Kurzrock R., Shete S. Cytokine genes and pain severity in lung cancer: exploring the influence of TNF-alpha-308 G/A IL6-174G/G and IL-8251T/A. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007, Vol. 16, no. 12, pp. 2745-2751.
9. Reyes-Gibby C.C., Wu X., Spitz M., Kurzrock R., Fisch M., Bruera E., Shete S. Molecular epidemiology, cancer-related symptoms, and cytokine pathway. *Lancet Oncol.*, 2008, Vol. 9, no. 8, pp. 777-785.
10. Spitz M.R., Wu X., Mills G. Integrative epidemiology: from risk assesment to outcome prediction. *J. Clin. Oncol.*, 2005, Vol. 23, no. 2, pp. 267-275.
11. Uceyler N., Eberle T., Rolke R., Birklein F., Sommer C. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain*, 2007, Vol. 132, no. 1-2, pp. 195-205.
12. Wang L., Jiang Y., Zhang Y., Wang Y., Huang S., Wang Z., Tian B., Yang Y., Jiang W., Pang D. Association Analysis of IL-17A and IL-17F Polymorphisms in Chinese Han Women with Breast Cancer. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 3, pp. 34400-34407.
13. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., McDevitt H.O., Duff G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, no. 7, pp. 3195-3199.
14. Zhao W., Xie W., Xiao Q., Beers D.R., Appel S.H. Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J. Neurochem.*, 2006, Vol. 99, no. 4, pp. 1176-1187.

Medical Immunology/Meditsinskaya Immunologiya
2014, Vol. 16, No 5, pp. 431-436

ORIGINAL ARTICLES

EVALUATION OF CYTOKINE GENE POLYMORPHISM IN B CELL LYMPHOID MALIGNANCIES

Nazarova E.L., Shardakov V.I., Demyanova V.T., Zagoskina T.P., Zotina E.N.

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

Abstract. Previous studies with some solid tumors has shown that polymorphisms of certain cytokine genes may be used as predictors of clinical outcome in the patients. It seemed important to evaluate potential correlations between production of certain pro- and anti-inflammatory cytokines and co-receptor molecules, and promoter polymorphism of the cytokine genes involved into regulation of cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism and blood clotting in the patients with hematological malignancies. The article contains our results concerning associations between of IL-1 β , -2, -4, -10, -17, TNF α , and allelic polymorphisms of their genes in 62 patients with B cell lymphoid malignancies in an ethnically homogenous group (self-identified as Russians). We have shown that the GA and AA genotypes of the G-308A polymorphism in TNF α gene are significantly associated with increased production of this cytokine, being more common in aggressive non-Hodgkin lymphomas, more rare in multiple myeloma and in indolent non-Hodgkin lymphomas. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 5, pp 431-436)

Keywords: B-cell lymphoid malignancies, gene polymorphism, cytokines, cytokine receptors

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-5-431-436>

Authors:

Nazarova E.L., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency of Russia, 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 and Biological Agency of Russia, Kirov, Russian Federation
Demyanova V.T., PhD (Biology), Senior Research Associate, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Kirov, Russian Federation
Zagoskina T.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Hematology Clinics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Kirov, Russian Federation
Zotina E.N., Junior Research Associate, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Kirov, Russian Federation

Address for correspondence:

Nazarova Elena L.

PhD, Leading Research Associate, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical and Biological Agency of Russia

610027. Russian Federation, Kirov, Krasnoarmeiskaya str., 72.

Phone: 7 (922) 920-89-01.

Fax: 7 (8332) 54-97-31.

E-mail: center.deputy@mail.ru

Received 17.12.2013

Accepted 16.01.2014