

А.В. Трембач^{1,2}, Е.И. Кондратьева^{1,3,4}, Е.В. Лошкова⁴, Н.В. Колесникова³,
Н.В. Тарасенко⁵, Т.В. Асекретова^{1,2}, В.В. Лебедев², А.И. Тлиф²

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ФЕНОТИПОВ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

¹ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, ²ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» МЗ Краснодарского края, ³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»,
⁴ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ,
⁵ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», РФ

Цель – проанализировать состояние цитокинового статуса (IL1 β , IL4, IL10, TNF α , IFN γ , антагониста рецептора IL1 – IL1Ra) и выявить ассоциации полиморфизмов генов-модификаторов иммунного ответа семейства интерлейкина 1 (VNTR полиморфизм гена *IL1RN*, *IL1B* (rs1143634), *TNFA*G-308A* (rs1800629) и фенотипов онкогематологических заболеваний (ОГЗ), а также их осложнений. Обследованы 70 детей (37 (53%) мальчиков и 33 (47%) девочки), средний возраст 7,6 \pm 2,59 лет с ОГЗ. На фоне патогенетической терапии все пациенты реализовали фебрильную нейтропению и неконтролируемый системный воспалительный ответ, на этом фоне уровни IL1 β , IL1Ra, IL10, IL4 были значительно повышены по сравнению с контрольной группой (p=0,001), концентрация IFN γ оказалась ниже в группе ОГЗ без Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (p=0,043). Наибольшую диагностическую значимость при прогнозировании неблагоприятного исхода приобретает оценка содержания IFN γ и TNF α , а при нарушении функции почек – IL1 β (p=0,001), а также концентрация IFN γ (p=0,003). Зарегистрирована ассоциация генотипа A2A2 (OR=3,01; 95% CI: 1,48–6,16; $\chi^2=9,91$; p=0,002) гена *IL1RN*VNTR* с риском развития ОГЗ. Получена ассоциация генотипа A2A2 (OR=19,09; 95% CI: 4,08–82,23; $\chi^2=25,6$; p=0,001) гена *IL1RN*VNTR* с отсутствием летального исхода и нарушением функции почек (OR=20,89; 95% CI: 2,7–196,5; $\chi^2=13,020$; p=0,001) при гемобластозах. Таким образом, показана высокая активность воспаления при ОГЗ в виде повышения про- и противовоспалительных цитокинов. Обнаружена ассоциация генотипа A2A и аллеля A2 гена *IL1RN*VNTR* с ОГЗ, неблагоприятными исходами (летальность).

Ключевые слова: полиморфизм генов цитокинов, онкогематологические заболевания, дети.

A.V. Trembach^{1,2}, E.I. Kondratieva^{1,3,4}, E.V. Loshkova⁴, N.V. Kolesnikova³,
N.V. Tarasenko⁵, T.V. Asekretova^{1,2}, V.V. Lebedev², A.I. Tlif²

IMMUNOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF HEMATOLOGICAL DISEASES INDIVIDUAL PHENOTYPES

¹Kuban State Medical University; ²Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar Region; ³Medical Genetic Research Center; ⁴Siberian State Medical University; ⁵Scientific Research Institute of Medical Genetics, Russia

Objective of the research – to analyze the cytokine status state (IL1 β , IL4, IL10, TNF α , IFN γ , IL1 receptor antagonist – IL1Ra) and to identify association polymorphisms of interleukin 1 family immune response genes-modifiers (VNTR polymorphism of gene *IL1RN*, *IL1B* (rs1143634)), *TNFA*G308A* (rs1800629) and oncohematological diseases (OHD) phenotypes and their complications. The study included 70 children (37 (53%) boys and 33 (47%) girls), average age 7,6 \pm 2,59 years with OHD. During pathogenetic therapy all patients realized febrile neutropenia and uncontrolled

Контактная информация:

Кондратьева Елена Ивановна – д.м.н., проф.,
руководитель научно-консультативного отдела
муковисцидоза ФГБНУ «Медико-генетический
научный центр»

Адрес: Россия, 115478, г. Москва,
ул. Москворечье, 1

Тел.: (495) 111-03-03, E-mail: elenafpk@mail.ru

Статья поступила 10.05.16,
принята к печати 15.07.16.

Contact Information:

Kondratieva Elena Ivanovna – MD., prof.,
Head of Scientific Advisory Department of Cystic
Fibrosis, Medical Genetic Research Center

Address: Russia, 115478, Moscow,
Moskvorechie str., 1

Tel.: (495) 111-03-03, E-mail: elenafpk@mail.ru

Received on May 10, 2016,

submitted for publication on Jul. 15, 2016.

systemic inflammatory response, so IL1 β , IL1Ra, IL10, IL4 levels were significantly increased compared with the control group (p=0,001), INF γ concentration was lower in group without OHD without T-ALL (p=0,043). The highest diagnostic value in predicting unfavorable outcome gets INF γ TNF α content evaluation, and in impaired renal function – IL1 β (p=0,001) and INF γ concentration (p=0,003). The study revealed association of A2A2 genotype (OR=3,01; 95% CI: 1,48–6,16; $\chi^2=9,91$; p=0,002) of *IL1RN*VNTR* gene with risk of OHD development. It also revealed association of A2A2 genotype (OR=19,09; 95% CI: 4,08–82,23; $\chi^2=25,6$; p=0,001) of *IL1RN*VNTR* gene with fatal outcome absence and impaired renal function (OR=20, 89; 95% CI: 2,7–196,5; $\chi^2=13,020$; p=0,001) at hemoblastoses. Thus, it showed high activity inflammation at OHD in form of increased pro and anti-inflammatory cytokines. It found association of A2A2 genotype and A2 allele gene *IL1RN*VNTR* with OHD and adverse outcomes (lethality).

Keywords: gene polymorphism of cytokines, oncohematological diseases, children.

Изучение особенностей цитокиновой и генетической регуляции иммунного ответа при лимфопролиферативном воспалении у больных с онкогематологическими заболеваниями (ОГЗ) является актуальным и может иметь значение в прогнозировании течения заболевания, развитии осложнений, что в конечном итоге открывает новые возможности для разработки подходов к терапии [1–5].

Цель исследования – проанализировать состояние цитокинового статуса (IL1 β , IL4, IL10, TNF α , INF γ , антагониста рецептора IL1 (IL1Ra)) и выявить ассоциации полиморфизмов генов-модификаторов иммунного ответа семейства интерлейкина 1 (VNTR полиморфизм гена *IL1RN*, *IL1B* (rs1143634)), *TNFA*G-308A* (rs1800629) с фенотипами ОГЗ и их осложнениями.

Материалы и методы исследования

Обследование детей с гемобластомами проводили на базе ГБУЗ ДККБ ДЗ КК г. Краснодара (заведующий отделением к.м.н. В.В. Лебедев, главный врач д.м.н., проф. Е.И. Клещенко). Для проведения исследования было получено разрешение этического комитета Кубанского государственного медицинского университета (протокол № 4 от 20.06.2011). Обследованы 70 детей (37 (53%) мальчиков и 33 (47%) девочки), средний возраст 7,6 \pm 2,59 лет) с ОГЗ, находящихся на лечении в гематологическом отделении ГБУЗ ДККБ г. Краснодара. Из них 39 детей наблюдались с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ), 4 ребенка – с В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ), у 4 детей был диагностирован острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), 8 пациентов – с Т-клеточной неходжскинской лимфомой (Т-НХЛ), 4 пациента – с В-клеточной неходжскинской лимфомой (В-НХЛ), 3 ребенка – с лимфомой Ходжкина (ЛХ). Больные получали следующие протоколы лечения: ALL-MB (2008); AML (2007); ВНХЛ 2010 mab, EURO – LB 02; SAA 94-Pilotstudie; LCH – 2005; OEPА, COPDAS, BEASCOPE ЛГМ-2007.

В работе использованы данные, полученные авторами при исследовании детей и взрослых с сахарным диабетом 1-го типа (n=285, возраст от 6 до 53 лет) с диабетической нефропатией (32 ребенка, средний возраст 13,7 \pm 0,4 лет) [6] и хро-

ническим пиелонефритом с нарушением функции почек (20 больных, из них 8 мальчиков и 12 девочек, с острой почечной недостаточностью (ОПН) наблюдались 13 детей и с хронической почечной недостаточностью (ХПН) – 7 пациентов, средний возраст 8,01 \pm 3,26 лет) [7]. Для подтверждения полученных нами ранее генетических ассоциаций группы детей с нарушением функции почек на фоне диабета и пиелонефрита были объединены вместе с больными ОГЗ, реализовавшими нарушение функции почек, в объединенный фенотип – «Нарушение функции почек».

В качестве популяционного контроля использовали группу из 243 человек, принадлежащих к славянскому населению (база данных ДНК ФГБНУ «НИИ медицинской генетики», г. Томск) и не имеющих по данным анамнеза полиэтиологического воспалительного процесса, признаков сердечно-сосудистых нарушений, сахарного диабета, а также других аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний. Средний возраст контрольной группы составил 44,3 \pm 0,7 лет. Контрольная группа для оценки цитокинового статуса включала 40 практически здоровых детей, сопоставимых по полу и возрасту, не имеющих симптомов ОРЗ в течение 2 месяцев перед обследованием.

Иммунологическое исследование (определение уровня IL1 β , IL1Ra, IL10, INF γ , TNF α , IL4 (пг/мл) ИФА (наборы ООО «Протеиновый контур») проведено 57 пациентам с ОГЗ.

Выбор генов для исследования осуществляли в соответствии со следующими критериями: вклад генов-модификаторов иммунного ответа и продуктов экспрессии генов в воспалительный процесс или патогенез заболевания, показанные в работах разных авторов (в настоящее время данные по большинству ассоциаций противоречивы), доказанное влияние гена на функциональную активность, количество конечного продукта. Выделение тотальной ДНК проводили из лимфоцитов периферической крови с использованием стандартной фенол-хлороформной методики. Выделенную ДНК замораживали и хранили при –20 °С до проведения генотипирования. Определение генотипов полиморфных локусов проводили методом оценки полиморфизма длин рестриционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ). Характеристика исследованных

Характеристика исследованных полиморфизмов генов

Гены	Хромосомный локус/ OMIM	rs	Полиморфизм	Локализация в гене
<i>IL1RN</i> [8]	2q14.2/147679	нет	VNTR	Интрон 2
<i>IL1B</i> [9]	2q14/147720	1143634	(+3953)A1/A2	Экзон 5
<i>TNFA*G-308A</i> [10]	6p21.3/191160	1800629	G(-308)A	Промотор

полиморфных маркеров представлена в табл. 1. Для проведения ПЦР использовали структуры праймеров и условия генотипирования, описанные в литературе. При анализе таблиц сопряженности оценивали значения статистики Пирсона Хи-квадрат (χ^2), достигнутый уровень значимости (p). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости р принимали равным 0,05. Частоту аллелей определяли методом простого счета ($n/2N$, где n – число раз встречаемости аллеля (у гомозигот он учитывался дважды) в выборке N генотипов. Статистическую достоверность отличия между группами определяли по точному двустороннему критерию Фишера с поправкой на количество выявленных аллелей. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Для сравнения частот аллелей и генотипов, оценки связи аллелей генов с заболеванием использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность при числе степеней свободы равном 1, а также двусторонний точный тест Фишера в случае, если ожидаемое значение хотя бы в одной ячейке таблицы сопряженности было меньше 5. Ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к заболеваниям оценивали по величине отношения шансов (OR) (Pearce, 1993). Доверительный интервал (ДИ) для OR вычисляли по методу Woolf [6, 7].

Результаты

Основными клиническими признаками ОГЗ были слабость, лихорадка, недомогание, боли в костях и суставах, кровоточивость слизистых оболочек, кожный геморрагический синдром, бледность. Лихорадка была связана с наличием бактериальной, вирусной, грибковой или протозойной инфекций, особенно на фоне глубокой нейтропении, и отмечалась у всех пациентов. Слабость в результате анемии и интоксикации отмечена у 100% детей. Распространение blast в лимфатические узлы, приводящее к развитию лимфоаденопатии, наблюдалось у 97% детей. Увеличение размеров печени и селезенки отмечено у 100% детей и проявлялась болями в животе, расширением средостения, инициальным увеличением яичек у мальчиков (? пациента). Геморрагический синдром проявлялся развитием петехий, экхимозов, кровоизлияний и регистрировался у 70% детей. Кровотечение из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) наблюдалось у 16 детей и было вызвано тромбоцитопенией, коагулопатией или токсическим воздействием химиотерапии на слизистую оболочку ЖКТ. Анемический синдром, проявляющийся слабостью, бледностью, изменениями в общем

анализе крови (ОАК), наблюдался у 100% детей. Кардиомиопатия развивается в результате применения кардиотоксических препаратов и интоксикации (выявлено у 20% детей в процессе терапии основного заболевания). Нарушение функции почек выявлено у 13 (19%) пациентов. Нейролейкоз, возникающий при инфильтрации бластами головного и спинного мозга отмечен у 35 детей с ОЛЛ. Поражение глаз – кровоизлияние в сетчатку, инфильтрация сосудов, отек соска зрительного нерва отмечены у 11 детей с ОГЗ. Снижение минеральной плотности костной ткани (МПКТ) ниже $-2,0$ зарегистрированы у 19 детей (после стандартизации фактических значений BMD по отношению к длине тела). В 14 (20%) случаях был зарегистрирован летальный исход.

На первом этапе исследования было проанализировано количественное содержание цитокинов при изучаемых фенотипах ОГЗ. На фоне терапии все пациенты реализовали фебрильную нейтропению и неконтролируемый системный воспалительный ответ, на этом фоне уровни $IL1\beta$, $IL1Ra$, $IL10$, $IL4$ были значительно повышены по сравнению с контрольной группой ($p=0,001$), концентрация $INF\gamma$ оказалась ниже в группе ОГЗ без Т-ОЛЛ ($p=0,043$) (табл. 2).

Показано также, что при летальном исходе, который был отмечен в 20% (14 пациентов) случаев, содержание $IL10$ и $IL4$ продолжает нарастать, превышая исходный уровень или уровень в отсутствии летального исхода в среднем в 2,5 раза и в 1,5 раза соответственно (табл. 3, рис. 1). Между тем наибольшую диагностическую зна-

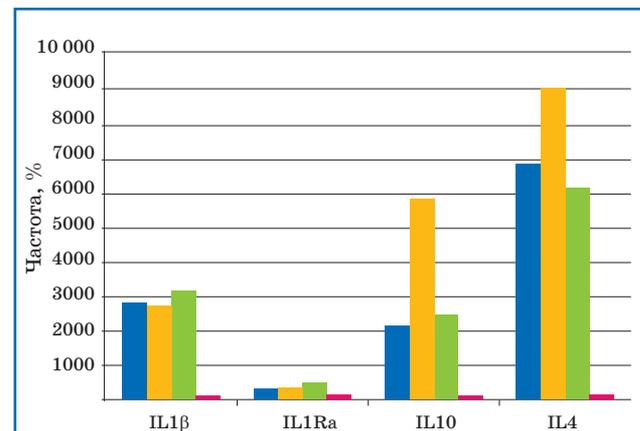


Рис. 1. Изменение цитокинового профиля крови у больных ОГЗ в зависимости от их исхода.

Здесь и на рис. 2: 1-й столбик – ОГЗ б/л – онкогематологические заболевания без летального исхода; 2-й столбик – ОГЗ л/и – онкогематологические заболевания с летальным исходом; 3-й столбик – ОГЗ – онкогематологические заболевания, 4-й столбик – контроль – условно здоровые лица.

Таблица 2

Содержание цитокинов в периферической крови при ОГЗ (Ме (Q₁-Q₃))

Показатели, пкг/мл	Общая группа (n=57)	Т-ОЛЛ (n=39)	Другие фенотипы (n=18)	Контроль (n=40)
IL1 β	224 (149,1-314,9) p ₀₋₃ =0,001	203,9 (149,1-314,9) p ₁₋₃ =0,001	343,7 (137,7-374,3) p ₁₋₃ =0,764 p ₂₋₃ =0,001	6,95 (1,24-15,92)
IL1Ra	68,18 (25,25-168,8) p ₀₋₃ =0,001	53,57 (24,03-168,8) p ₁₋₃ =0,001	74,07 (24,5-181) p ₁₋₃ =0,339 p ₂₋₃ =0,001	12,72 (10,85-13,04)
IL10	69,16 (0,09-109,2) p ₀₋₃ =0,001	69,16 (0,08-119,2) p ₁₋₃ =0,001	72,5 (19,4-101,1) p ₁₋₃ =0,949 p ₂₋₃ =0,001	2,55 (0-11,41)
INF γ	44,29 (12,61-112,7) p ₀₋₃ =0,238	51,35 (19-116,7) p ₁₋₃ =0,257	33,8 (0,07-120,9) p ₁₋₃ =0,066 p ₂₋₃ =0,043	50,87 (50,25-52,46)
TNF α	28 (16-42) p ₀₋₃ =0,714	27 (14-45) p ₁₋₃ =0,892	35 (21-43,5) p ₁₋₃ =0,286 p ₂₋₃ =0,913	35,38 (22,93-50,85)
IL4	19 (11-33) p ₀₋₃ =0,001	21 (13-37) p ₁₋₃ =0,001	16,0 (5,8-27,8) p ₁₋₃ =0,587 p ₂₋₃ =0,001	0,3 (0,1-5,15)

Таблица 3

Содержание цитокинов в периферической крови при ОГЗ в зависимости от их исхода (Ме (Q₁-Q₃))

Показатели, пкг/мл	Общая группа (n=57)	ОГЗ без летальности (n=43)	ОГЗ и летальность (n=14)	Контроль (n=40)
IL1 β	224 (149,1-314,9) p ₀₋₃ =0,001	204,8 (149,1-314,9) p ₁₋₃ =0,001	199,7 (166,1-297,2) p ₁₋₃ =0,934 p ₂₋₃ =0,001	6,95 (1,24-15,92)
IL1Ra	68,18 (25,25-168,8) p ₀₋₃ =0,001	53,57 (19,29-172) p ₁₋₃ =0,001	58,5 (42,6-97,1) p ₁₋₃ =0,646 p ₂₋₃ =0,001	12,72 (10,85-13,04)
IL10	69,16 (0,09-109,2) p ₀₋₃ =0,001	59,16 (0,08-115,8) p ₁₋₃ =0,001	150,85 (59,6-219,2) p ₁₋₃ =0,139 p ₂₋₃ =0,001	2,55 (0-11,41)
INF γ	44,29 (12,61-112,7) p ₀₋₃ =0,238	44,11 (19-98,87) p ₁₋₃ =0,513	137,6 (64,6-203,6) p ₁₋₃ =0,279 p ₂₋₃ =0,017	50,87 (50,25-52,46)
TNF α	28 (16-42) p ₀₋₃ =0,714	26 (12-45) p ₁₋₃ =0,708	68,5 (21-132,5) p ₁₋₃ =0,608 p ₂₋₃ =0,036	35,38 (22,93-50,85)
IL4	19 (11-33) p ₀₋₃ =0,001	21 (13-37) p ₁₋₃ =0,001	27,5 (13,5-38,5) p ₁₋₃ =0,931 p ₂₋₃ =0,001	0,3 (0,1-5,15)

чимостью при прогнозировании неблагоприятного исхода приобретает оценка содержания INF γ и TNF α , поскольку только при летальном исходе ОГЗ их уровень достоверно возрастает (табл. 3, рис. 2).

Проведенное исследование показало, что

наличие системной воспалительной реакции при ОГЗ не зависит от их фенотипов и носит сходный характер продукции цитокинов. Оценка таких цитокинов периферической крови, как INF γ и TNF α , позволяет прогнозировать неблагоприятный исход у больных ОГЗ.

Таблица 4

Содержание цитокинов в периферической крови при ОГЗ при НФП в составе мультиорганной недостаточности (Ме (Q₁-Q₃))

Показатели, пкг/мл	Общая группа (n=57)	ОГЗ без НФП (n=44)	ОГЗ и НФП (n=13)	Контроль (n=40)
IL1β	224 (149,1-314,9) p ₀₋₃ =0,001	146,8 (120,7-159,5) p ₁₋₃ =0,001	311,8 (244,8-390,9) p ₁₋₃ =0,001 p ₂₋₃ =0,001	6,95 (1,24-15,92)
IL1Ra	68,18 (25,25-168,8) p ₀₋₃ =0,001	36,08 (14,03-175,3) p ₁₋₃ =0,001	87,4 (30,9-168,8) p ₁₋₃ =0,169 p ₂₋₃ =0,001	12,72 (10,85-13,04)
IL10	69,16 (0,09-109,2) p ₀₋₃ =0,001	59,16 (2,46-102,5) p ₁₋₃ =0,001	72,5 (0-119,2) p ₁₋₃ =0,44 p ₂₋₃ =0,001	2,55 (0,-11,41)
INFγ	44,29 (12,61-112,7) p ₀₋₃ =0,589	28,27 (0,9-60,5) p ₁₋₃ =0,024	95,6 (21,6-182,7) p ₁₋₃ =0,003 p ₂₋₃ =0,008	50,87 (50,25-52,46)
TNFα	28 (16-42) p ₀₋₃ =0,714	27 (14-38) p ₁₋₃ =0,671	31,5 (18-45) p ₁₋₃ =0,518 p ₂₋₃ =0,636	35,38 (22,93-50,85)
IL4	19 (11-33) p ₀₋₃ =0,001	15 (10-27) p ₁₋₃ =0,001	22 (13-37) p ₁₋₃ =0,109 p ₂₋₃ =0,001	0,3 (0,1-5,15)

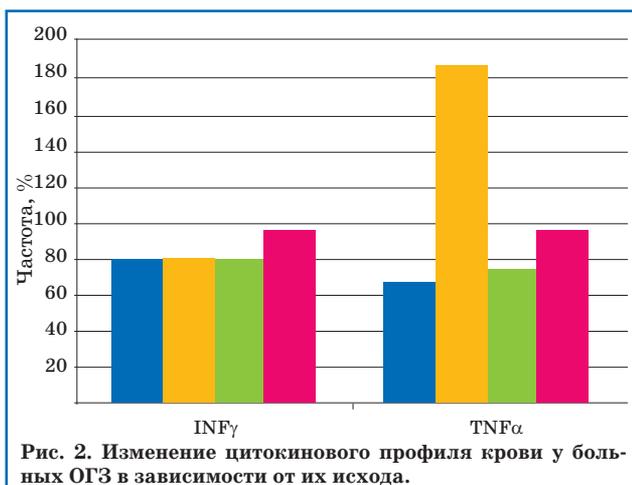


Рис. 2. Изменение цитокинового профиля крови у больных ОГЗ в зависимости от их исхода.

Нарушение функции почек (НФП) выявлено у 13 (19%) пациентов в виде ОПН в составе мультиорганной недостаточности на фоне нейтропенической лихорадки. При этом наиболее высокими оказались значения IL1β (p=0,001), а также концентрации INFγ (p=0,003), по сравнению с пациентами без НФП и контрольной группой (табл. 4).

На втором этапе исследования проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов-модификаторов иммунного ответа между контрольной группой, общей группой больных и отдельными фенотипами ОГЗ (В-ОЛЛ, Т-ОЛЛ, ОМЛ, Т-НХЛ, В-НХЛ, ЛХ), а также исходами и осложнениями ОГЗ.

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера VNTR гена IL1RN в группе детей с ОГЗ и в контрольной группе показал наличие досто-

верных отличий. Зарегистрирована ассоциация генотипа A2A2 (OR=3,01; 95% CI: 1,48-6,16; χ²=9,91; p=0,002) и аллеля A2 (OR=2,26; 95% CI: 1,31-3,92; χ²=9,04; p=0,003) гена IL1RN*VNTR с риском развития ОГЗ (табл. 5).

Ассоциативный поиск между отдельными фенотипами ОГЗ и контрольной группой показал наличие значимых ассоциаций. Так, при сравнении с контрольной группой продемонстрирована ассоциация генотипа A2A2 (OR=21,69; 95% CI: 4,18-150,5; χ²=28,59; p=0,001) и аллеля A2 (OR=2,52; 5% CI: 1,32-4,81; χ²=9,509; p=0,002) гена IL1RN*VNTR с развитием фенотипа Т-ОЛЛ (табл. 5). Сравнение с контрольной группой показало ассоциацию генотипа A2A2 (OR=13,43; 95% CI: 1,12-167,5; χ²=8,134; p=0,017) гена IL1RN*VNTR с развитием Т-НХЛ (табл. 5).

Получена ассоциация генотипа A2A2 (OR=19,09; 95% CI: 4,08-82,23; χ²=25,6; p=0,001) аллеля A2 (OR=2,4; 95% CI: 1,35-4,27; χ²=9,44; p=0,002) гена IL1RN*VNTR с отсутствием летального исхода (табл. 5).

Сравнение группы пациентов с НФП и контрольной группой показало наличие положительной ассоциации генотипа A2A2 (OR=20,89; 95% CI: 2,7-196,5; χ²=13,020; p=0,001) и аллеля A2 (OR=3,05; 95% CI: 1,15-8,02; χ²=5,280; p=0,021) полиморфного варианта VNTR гена IL1RN с НФП на фоне нейтропенической лихорадки при ОГЗ (табл. 5).

Для повышения достоверности полученных результатов и проверки найденных ассоциаций было проведено сравнение контрольной группы и группы пациентов с сахарным диабетом, пие-

Сравнительный анализ ассоциаций аллелей и генотипов полиморфных маркеров генов цитокинов среди пациентов с различными фенотипами ОГЗ

Ген, предрасполагающий аллель/генотип	Аллели			Генотипы		
	OR	CI	χ^2 (p)	OR	CI	χ^2 (p)
Фенотип ОГЗ и контроль						
<i>IL1B</i> (rs1143634) A2, A2A2	1,24	0,74–2,08	0,56 (0,453)	1,18	0,3–4,61	0,00 (0,958)
<i>IL1RN</i> *VNTR A2, A2A2	2,26	1,31–3,92	9,04 (0,003)	3,01	1,48–6,16	9,91 (0,002)
<i>TNFA</i> *G-308A (rs1800629) G, GG	1,02	0,53–1,99	0,01 (0,935)	1,06	0,48–2,35	0,00 (0,984)
Фенотип Т-ОЛЛ и контроль						
<i>IL1RN</i> *VNTR A2, A2A2	2,52	1,32–4,81	9,509 (0,002)	21,69	4,18–150,5	28,59 (0,001)
Фенотип Т-НХЛ						
<i>IL1RN</i> *VNTR A2, A2A2	2,11	0,66–6,55	2,68 (0,102)	13,43	1,12–167,5	8,13 (0,017)
Фенотип ОГЗ без летального исхода и контроль						
<i>IL1RN</i> *VNTR	2,4	1,35–4,27	9,44 (0,002)	19,09	4,09–82,23	25,6 (0,001)
Фенотип ОГЗ, осложненный НФП, и контроль						
<i>IL1RN</i> * VNTR A2, A2A2	3,05	1,15–8,02	5,28 (0,021)	20,89	2,7–196,5	13,02 (0,001)
Объединенный фенотип «Нарушение функции почек» и контроль						
<i>IL1RN</i> * VNTR A2, A2A2	1,84	1,13–3	6,25 (0,012)	7,29	1,57–46,72	9,98 (0,007)

p – приведено для теста χ^2 .

лонефритом, ОГЗ, сопровождающимися НФП (объединенный фенотип «Нарушение функции почек»). В результате получена ассоциация с генотипом A2A2 (OR=7,29; 95% CI: 1,57–46,72; $\chi^2=9,980$; p=0,007) и аллелем A2 (OR=1,84; 95% CI: 1,13–3; $\chi^2=6,25$; p=0,012) полиморфного варианта VNTR гена *IL1RN* для пациентов с фенотипом «Нарушение функции почек» на фоне различных заболеваний (сахарный диабет 1-го типа, пиелонефрит, ОГЗ), представляющих собой разные модели воспаления (аутоиммунное, микробное, лимфопролиферативное) (табл. 5).

На третьем этапе исследования было проанализировано содержание цитокинов в сыворотке крови в зависимости от генотипов пациентов.

Анализ цитокинового статуса пациентов с ОГЗ в зависимости от изучаемых генов-модификаторов иммунного ответа показал, что среди носителей генотипа A2A2 гена *IL1RN* (VNTR) зарегистрировано высокое содержание IL10 (p=0,041) по сравнению с носителями генотипа A1A1 (табл. 6). Анализ содержания цитокинов у детей с ОГЗ в зависимости от генотипов гена *IL1B* (rs1143634) выявил повышение концентрации IL10 у обладателей генотипа A2A2 (p=0,027) по сравнению с носителями A1A1 (табл. 6). Анализ содержания цитокинов у больных в зависимости от генотипов гена *TNF* (rs1800629) показал, что среди носителей генотипа GA зарегистрировано высокое содержание TNF α (p=0,035) по сравне-

нию с носителями генотипа GG и общей группой (табл. 6).

Обсуждение

ОГЗ представляют лимфопролиферативную модель воспаления [11]. Определение иммунологического варианта ОГЗ позволяет в настоящее время отслеживать наличие достигнутой ремиссии, ее сохранение и угрозу развития рецидива заболевания на клеточном уровне [12]. В то же время роль цитокинового статуса пациента и его генетического контроля в патогенезе ОГЗ и их клинических проявлений требует изучения и может быть полезна в разработке подходов биологической, в т.ч. антицитокиновой терапии [2, 13].

Активно изучается продукция цитокинов на фоне онкологических заболеваний различной локализации, по данной проблеме ежегодно публикуются десятки исследований. Подавляющее большинство работ, в т.ч. метаанализов, демонстрирует многократно повышенную выработку основных провоспалительных цитокинов на фоне злокачественных новообразований различной локализации, в т.ч. при раке крови [3, 14–16]. В нашей работе была продемонстрирована высокая продукция основных провоспалительных (IL1 β , IL4; p=0,001) и прогнатовоспалительных (IL1Ra, IL10; p=0,001) цитокинов на фоне ОГЗ при развитии фебрильной нейтропении.

Таким образом, проведенными исследованиями выявлено, что наличие системной вос-

Таблица 6

Уровень цитокинов в зависимости от генотипов генов-модификаторов иммунного ответа, Me (Q₁–Q₃)

Группа	0	1	2	3	p
Показатели/ полиморфизм	Общая группа (n=55)	A1A1, (n=33)	A1A2, (n=8)	A2A2, (n=14)	
IL10/ <i>IL1RN</i> (VNTR)	69,16 (0,08–109,2)	52,49 (0,07–102,5) p ₀₋₁ =0,314	85,83 (29,14–107,5) p ₀₋₂ =1	89,17 (45,82–155,9) p ₀₋₃ =0,22	p ₁₋₂ =1 p ₁₋₃ =0,041 p ₂₋₃ =0,262
IL10/ IL1B (rs1143634)	Общая группа (n=55)	A1A1, (n=33)	A1A2, (n=21)	A2A2, (n=1)	p ₁₋₂ =0,027 p ₁₋₃ =1 p ₂₋₃ =1
	69,16 (0,08–109,2)	59,16 (0,07–102,5) p ₀₋₁ =0,195	85,84 (25,81–145,9) p ₀₋₂ =0,130	32,48 (32,48–32,48) p ₀₋₃ =1	
TNFα/ <i>TNF</i> (rs1800629)	Общая группа (n=55)	GG, (n=47)	GA, (n=8)		p ₀₋₁ =0,335 p ₀₋₂ =0,035 p ₁₋₂ =0,035
	28 (16–45)	27 (14–38)	44,5 (25,5–65)		

p_{1-2,3} – достоверность различия показателей между группами пациентов с генотипами A1A1, A1A2, A2A2 и генотипами GG, GA; единицы измерения – пкг/мл.

палительной реакции при ОГЗ не зависит от их фенотипов и носит сходный характер продукции цитокинов. Однако обращает на себя внимание тот факт, что при ОГЗ в наибольшей степени возрастает продукция IL4 Т-хелперами 2-го порядка, что свидетельствует о более резком усилении гуморального компонента в системной воспалительной реакции, а в наименьшей степени увеличивается содержание противовоспалительного IL1Ra, который, существенно уступая в сывороточном содержании IL1β, свидетельствует о мощном провоспалительном характере цитокинов в семействе IL1, играющем ведущую патогенетическую роль в системном воспалении при ОГЗ. Оценка таких цитокинов периферической крови, как INFγ (p=0,017) и TNFα (p=0,036) позволяет прогнозировать неблагоприятный исход у больных ОГЗ, так как их достоверное возрастание наблюдается при летальном исходе.

На фоне развития нефропатии у пациентов максимальными оказались концентрации IL1β (p=0,001) и INFγ (p=0,003), что свидетельствует о влиянии цитокинового дисбаланса на органы-мишени, где наиболее подверженными цитокиновой «агрессии» являются почки.

Во многих исследованиях было показано, что носительство генотипа A2A2 гена *IL1RN* связано с высокой продукцией провоспалительных цитокинов и неблагоприятными исходами на фоне развития септического состояния при различных заболеваниях [3, 13]. Так, в 2013 г. опубликованы результаты генетического исследования, включившего 57 детей с ОЛЛ, показавшие многократное увеличение риска развития септического шока (OR=45,0; p=0,001) среди гомозиготных (*IL1RN**2/*IL1RN**2) и гетерозиготных (*ILRN**1/*ILRN**2) носителей гена *IL1RN* [14]. В нашей работе получены аналогичные результаты, показавшие ассоциацию генотипа A2A2 (OR=3,01; p=0,002) и аллеля A2 (OR=2,26; p=0,003) гена

IL1RN с риском развития ОГЗ. Для носителей генотипа A2A2 гена *IL1RN***VNTR* показано значительное увеличение риска (OR=21,69; p=0,001) развития ОЛЛ. Активно исследуются полиморфизмы генов цитокинов и в отношении различных клинических фенотипов ОГЗ, в частности, фебрильной нейтропении. Так, в работе турецких авторов, включившей исходы острого лейкоза у 60 детей, показано отсутствие связи между развитием фебрильной нейтропении и изучаемыми полиморфизмами генов IL4 и IL1RA [5]. Было выявлено, что обладатели генотипа A2A2. Нарушение функции почек (OR=19,09; p=0,001) и аллеля A2 (OR=2,4; p=0,002) гена *IL1RN***VNTR* имеют гораздо меньший риск развития летального исхода, что совпало с нашими данными.

НФП может развиваться на фоне хронического пиелонефрита, сахарного диабета 1-го типа (диабетическая нефропатия), острые нарушения функции почек реализуются при химиотерапии ОГЗ. В нашем исследовании продемонстрирован высокий риск развития нарушений почечной функции среди носителей генотипа A2A2 (OR=20,89; p=0,001) и аллеля A2 (OR=3,05; p=0,021) гена *IL1RN***VNTR* при ОГЗ, а также при объединенном фенотипе «Нарушение функции почек».

В проведенном исследовании было показано, что аллель A2 *VNTR* полиморфизма гена *IL1RN* в гомозиготном состоянии ассоциирован с активной выработкой противовоспалительного цитокина IL10 (p=0,041). Носительство генотипа A2A2 гена *IL1B* (rs1143634) связано с высокой продукцией IL10 (p=0,027). Концентрация TNFα была максимальной у носителей аллеля G в гетерозиготном состоянии гена *TNF* (rs1800629). Носители аллеля G полиморфизма rs1800629 гена *TNF* в гетерозиготном состоянии характеризуется высокой активностью одного из

мощных провоспалительных цитокинов – TNF α ($p=0,035$), высокая активность которого также была продемонстрирована при ОГЗ [17].

Воспалительный процесс лежит в основе заболеваний различного генеза (бактериальных, аутоиммунных, аллергических, лимфопролиферативных, метаболических) и характеризуется как общностью изменений цитокинового статуса, так и его особенностями. В наших работах [18, 19] было показано, что микробно-воспалительный и лимфопролиферативный процессы ассоциированы с генотипом A2A2 и аллелем A2 гена *IL1RN*VNTR*, что требует дальнейшего осмысления и проведения исследований в этом направлении. Полученные ассоциации будут иметь значение для прогнозирования состояния почек (выделение групп риска и проведение превентивных мер) на фоне различных по патогенезу заболеваний в педиатрии.

В приложении к современным геномным исследованиям воспаления концепция исследования генов цитокинов позволяет разработать подход к более фокусированному анализу гене-

тического разнообразия, закономерному сужению спектра генов-кандидатов и их маркеров, рассматриваемых с точки зрения возможной предрасполагающей к общим патологическим процессам. Полученные результаты могут быть транслированы в практическую медицину для прогнозирования течения патологического процесса. Долгосрочный индивидуальный прогноз для конкретного лица и проведение необходимых терапевтических мероприятий необходимы для предотвращения развития заболевания или снижения тяжести его течения и профилактики осложнений.

Заключение

Показана высокая активность воспаления при ОГЗ в виде повышения про- и противовоспалительных цитокинов. Установлена их особенность при различных фенотипах и генотипах. Обнаружена ассоциация генотипа A2A2 и аллеля A2 гена *IL1RN*VNTR* с ОГЗ, отдельными их фенотипами (ОЛЛ), неблагоприятными исходами (летальность) и осложнениями в виде НПФ.

Литература

1. Urayama KY, Chokkalingam AP, Manabe A, Mizutani S. Current evidence for an inherited genetic basis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Hematol.* 2013; 97 (1): 3–19. Epub. 2012 Dec 13.
2. Zhou X, Zhou S, Li B, Li Q, Gao L, Li D, Gong Q, Zhu L, Wang J, Wang N, Huang L, Zhao L, Li Z, Zhou J. Transmembrane TNF- α preferentially expressed by leukemia stem cells and blasts is a potent target for antibody therapy. *Blood.* 2015; Sep. 17 126 (12): 1433–1442. doi: 10.1182/blood-2015-01-624833. Epub. 2015 Jul 29.
3. Zhang AQ, Pan W, Gao JW, Yue CL, Zeng L, Gu W, Jiang JX. Associations between interleukin 1 gene polymorphisms and sepsis risk: a meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 2014 Jan 16; 15: 8. Epub. 2014 Jan 16.
4. Zapata-Tarrés M, Arredondo-García JL, Rivera-Luna R, Klünder-Klünder M, Mancilla-Ramírez J, Sánchez-Urbina R, Vázquez-Cruz MY, Juárez-Villegas LE, Palomo-Colli MA. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism increases susceptibility to septic shock in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2013; 32 (2): 136–139. doi: 10.1097/INF.0b013e31827566dd.
5. Pehlivan M, Sahin HH, Ozdilli K, et al. Gene polymorphisms and febrile neutropenia in acute leukemia no association with IL4, CCR5, IL1RA, but the MBL2, ACE, and TLR4 are associated with the disease in Turkish patients: a preliminary study. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 2014; 18 (7): 474–481.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984: 480 с.
7. Bland JM, Altman DG. Statistics notes. The odds ratio. *BMJ.* 2000; 320 (7247): 1468.
8. Patel R, Lim DS, Reddy D, et al. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32 (12): 2369–2377.
9. Tarlow JK, Blakemore IF, Lennard A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable number of an 86-bp tandem repeat. *Hum. Genet.* 1993; 91: 403–404.
10. Wilkinson RJ, Patel P, Llewelyn M, et al. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL) 1 receptor antagonist and IL1 β on tuberculosis. *J. Exp. Med.* 1999; 189 (12): 1863–1873.
11. Somintara S, Leardkamolkarn V, Suttiarporn P, Mahatheeranont S. Anti-Tumor and Immune Enhancing Activities of Rice Bran Gramisterol on Acute Myelogenous Leukemia. *PLoS One.* 2016; 11 (1): 0146869. doi: 10.1371/journal.pone.0146869. Collection 2016.
12. Bock S, Murgueitio MS, Wolber G, Weindl G. Acute myeloid leukaemia-derived Langerhans-like cells enhance Th1 polarization upon TLR2 engagement. *Pharmacol. Res.* 2016 Jan 18. pii: S1043-6618(16)00022-0. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.016.
13. Meyer NJ, Ferguson JF, Feng R, Wang F, Patel PN, Li M, Xue C, Qu L, Liu Y, Boyd JH, et al. A functional synonymous coding variant in the *IL1RN* gene is associated with survival in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; Sep. 17 190 (6): 656–664.
14. Xiao H, Chen L, Luo G, et al. Effect of the cytokine levels in serum on osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2014; 35 (2): 1023–1028.
15. Demeter J, Messer G, Rämisch S, Mee JB, di Giovine FS, Schmid M, Herrmann F, Porzolt F. Polymorphism within the second intron of the IL1 receptor antagonist gene in patients with hematopoietic malignancies. *Cytokines Mol. Ther.* 1996; 2 (4): 239–242.
16. Zhang Y, Liu C, Peng H, et al. IL1 receptor antagonist gene *IL1-RN* variable number of tandem repeats polymorphism and cancer risk: a literature review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e46017.
17. Kim MS, Kang JW, Jeon JS, Kim JK, Kim JW, Hong J, Yoon DY. IL-32 θ gene expression in acute myeloid leukemia suppresses TNF α production. *Oncotarget.* 2015; 6 (38): 40747–40761. doi: 10.18632/oncotarget.5688.
18. Кондратьева Е.И., Терентьева А.А., Тарасенко Н.В., Лошкова Е.В., Тлиф А.И. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов цитокинов с клиническими вариантами пиелонефрита. *Вопросы современной педиатрии.* 2014; 6 (1): 28–32.
19. Кондратьева Е.И., Лошкова Е.В., Тарасенко Н.В., Тлиф А.И., Янкина Г.Н., Терентьева А.А., Степаненко Н.П., Гаприндашвили Е.Г., Асекретова Т.В., Трембач А.В., Мозгоногова С.В., Горев В.В. Изучение вклада генов семейства интерлейкина 1 (*IL1RN*, *IL1B*) на примере различных моделей воспаления в детском возрасте. *Цитокины и воспаление.* 2015; 14 (1): 43–50.